

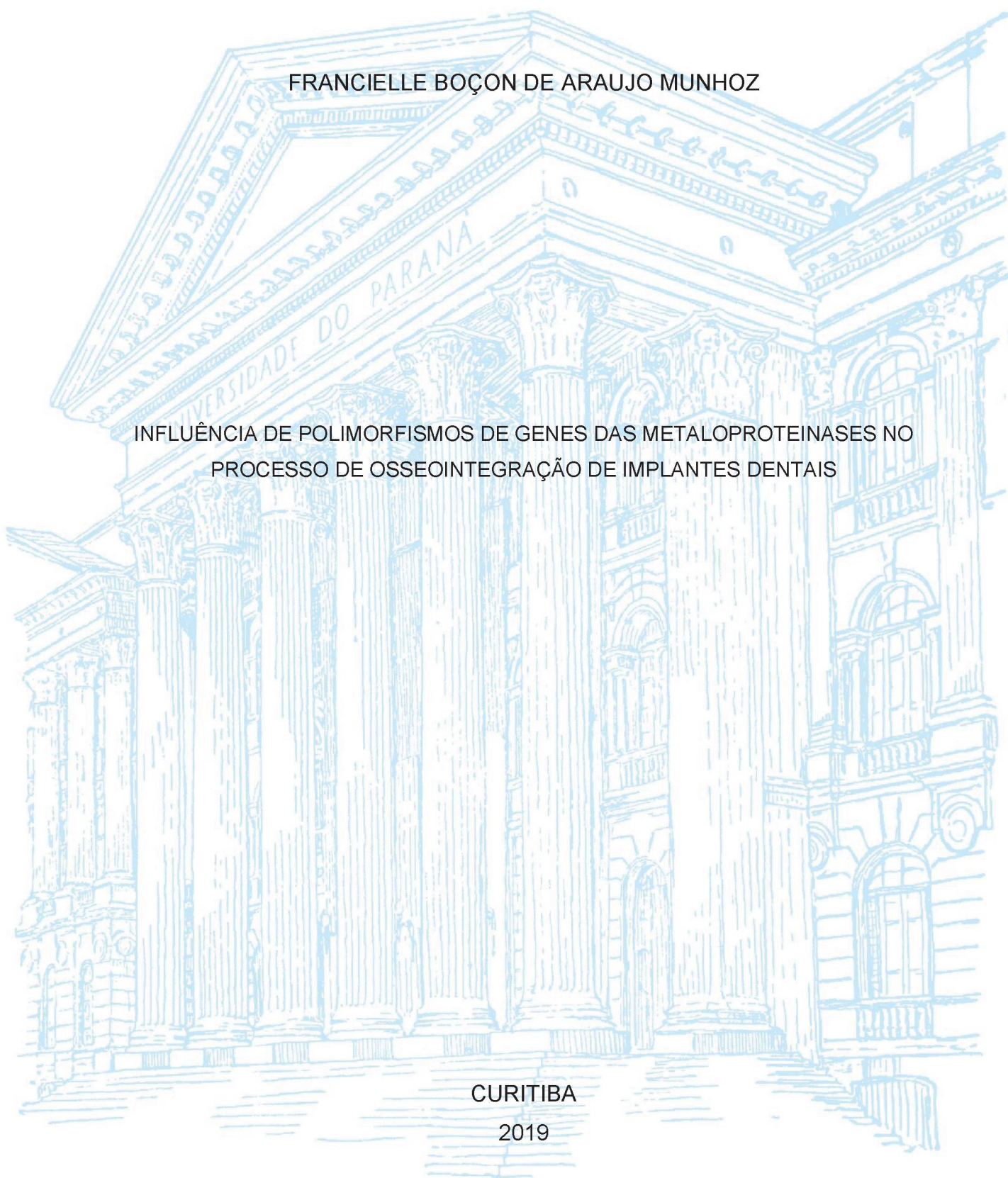
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLE BOÇON DE ARAUJO MUNHOZ

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES DAS METALOPROTEINASES NO  
PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTAIS

CURITIBA

2019



FRANCIELLE BOÇON DE ARAUJO MUNHOZ

INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DE GENES DAS METALOPROTEINASES NO  
PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Leme Godoy dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen de Souza

CURITIBA

2019



Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Munhoz, Francielle Boçon de Araujo

Influência de polimorfismos de genes das metaloproteínases o processo de osseointegração de implantes dentais. / Franciele Boçon de Araujo Munhoz. – Curitiba, 2019.

92 p.: il.

Orientador: Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

Coorientador: Ricardo Lehtonen de Souza

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Osseointegração 2. Implantação dentária 3. Metaloproteases 4. Polimorfismo (Genética) 5. Fatores de risco I. Título II. Santos, Maria Cristina Leme Godoy dos III. Souza, Ricardo Lehtonen Rodrigues de, 1970- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 617.693




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8


## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR** da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIELLE BOCON DE ARAUJO MUNHOZ** intitulada: **Influência de polimorfismos de genes das metaloproteinases no processo de osseointegração de implantes dentais**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

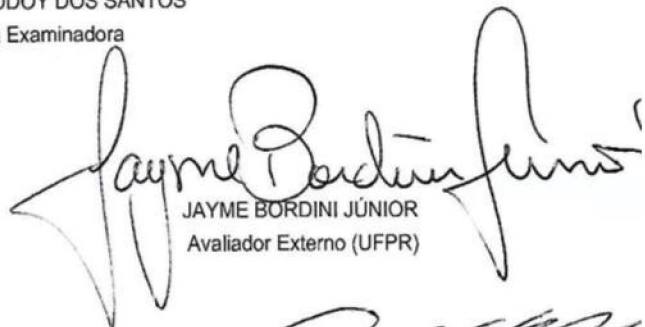
A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


Curitiba, 20 de Fevereiro de 2019.

  
MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS  
Presidente da Banca Examinadora

  
ATILA FERNANDO VISINONI  
Avaliador Externo-(UP)

  
LUPE FURTADO ALLE  
Avaliador Externo (UFPR)

  
JAYME BORDINI JÚNIOR  
Avaliador Externo (UFPR)

  
ANDREA SENFF RIBEIRO  
Avaliador Interno (UFPR)

Dedico esse trabalho ao meu esposo Cristiano, por acreditar no meu potencial e sempre me apoiar na concretização dos meus sonhos, aos meus filhos Vitor e Heitor, por darem sentido a minha vida e enchê-la de alegria e amor.

Ao meu Pai Ismael, que mesmo não estando mais entre nós, me doou seu amor, que permanece em meu coração.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela minha vida, proteção, saúde, amor, e por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho que me ajudam e me apoiam.

A minha professora e orientadora Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, pela boa vontade, apoio, incentivo, paciência e tempo despendido para a conclusão deste trabalho.

Ao meu Coorientador Ricardo Lehtonen de Souza e sua equipe, pelo acolhimento, incentivo e disponibilização do laboratório para a realização deste trabalho.

Ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular e Genética, pela colaboração, amizade e companheirismo.

A wide, flat beach at sunset. The sand is light-colored and shows several footprints. The horizon is low, with the sun setting in the distance, creating a warm, orange glow across the sky and reflecting on the wet sand. The overall mood is peaceful and nostalgic.

## PEGADAS NA AREIA

...Quando viste na areia, apenas um par de pegadas,  
eram as minhas. Foi exatamente aí, que te carreguei nos  
braços.

(Mary Stevenson, 1936)

## RESUMO

Os implantes dentais osseointegrados revolucionaram a implantodontia e são amplamente utilizados para substituir dentes ausentes, aliando funcionalidade e estética. Apesar desse procedimento apresentar resultados previsíveis, reprodutíveis e estáveis garantindo alto índice de sucesso, falhas durante a osseointegração podem culminar na perda precoce do implante. Considerando que algumas perdas ocorrem sem causa clinicamente definida e por vezes concentradas em determinados indivíduos, sugere-se que fatores genéticos podem desempenhar papel importante no processo de osseointegração. Metaloproteinases da matriz (MMPs) são mediadores essenciais durante a remodelação tecidual e participam ativamente da osseointegração. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de MMPs influenciam o nível de expressão dessas enzimas e podem estar relacionados à perda precoce de implante. Esse estudo de associação duplo-cego teve por objetivo analisar o papel de SNPs de MMPs isoladamente e em haplótipo na osseointegração de implantes dentais. Foram avaliados os SNPs MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) e MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) em 200 voluntários brasileiros, saudáveis, não-fumantes de três regiões do Brasil (São Paulo, Paraná e Santa Catarina), divididos em Grupo-Caso, os que sofreram perda de um ou mais implantes, considerando mobilidade e/ou dor com necessidade de remoção, e Grupo-Controle, pareados ao acaso por idade, sexo e posição do implante, que obtiveram sucesso no tratamento estando em carga funcional há pelo menos 1 ano. Células epiteliais da mucosa bucal foram coletadas com bochecho de glicose 3% e tiveram seu DNA extraído com acetato de amônio. Para amplificação e digestão das amostras, utilizou-se a técnica de reação de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), os genótipos foram analisados através de eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida. Os resultados analisados estatisticamente por meio de teste qui-quadrado, desequilíbrio de ligação, equilíbrio de Hardy-Weinberg, haplótipos e regressão logística múltipla. Em conclusão, o presente estudo mostrou que a presença dos polimorfismos isolados e em haplótipo influenciam o processo de osseointegração. Os SNPs MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) e MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307), influenciam individualmente a perda precoce do implante, enquanto os SNPs da MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393) e MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242), não são fatores isolados de risco à perda precoce de implante osseointegrado. A análise dos haplótipos dos SNPs MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750) e MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) sugere que o haplótipo T-A-GG-5A representa um fator de risco, enquanto os haplótipos C-A-G-6A e C-G-G-6A tem efeito protetivo. A elucidação do papel de SNPs de MMPs na perda precoce de implantes dentais colabora para melhor compreensão do processo de osseointegração e pode contribuir no reconhecimento de pacientes de risco, auxiliar o desenvolvimento de estratégias de modulação dos marcadores genéticos e garantir um tratamento adequado e individualizado.

Palavras chaves: Metaloproteinases, Polimorfismos, Osseointegração, Fator de Risco, Implante Dental.



## ABSTRACT

Osseointegrated dental implants have revolutionized implant dentistry and are widely used to replace missing teeth, combining functionality and aesthetics. Although this procedure presents predictable, reproducible and stable results guaranteeing a high success rate, failures during osseointegration can lead to the early loss of the implant. Considering that some losses occur without a clinically defined cause and sometimes concentrated in certain individuals, it is suggested that genetic factors seem to play an important role in the osseointegration process. Matrix metalloproteinases (MMPs) are essential mediators during tissue remodeling and actively participate in osseointegration. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in MMP genes influence the expression level of these enzymes and may be related to early implant loss. This double-blind association study aimed to analyze the role of SNPs of MMPs alone and in haplotype in osseointegration of dental implants. MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) and MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) in 200 healthy, non-smoked Brazilian volunteers from three regions of Brazil (São Paulo, Paraná and Santa Catarina). The volunteers were divided into a Case group, those who suffered loss of one or more osseointegrated implants, considering mobility and/or pain with need of implant removal, and Control group volunteers matched to cases by age, sex, number and position of implants and who were successful in treatment with implants in functional load for at least 1 year. Epithelial cells of the buccal mucosa were collected with 3% glucose mouthwash and had their DNA extracted with ammonium acetate. For amplification and digestion of the samples, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) techniques were used, the genotypes were analyzed by electrophoresis on agarose or polyacrylamide gels. The results were statistically analyzed using chi-square test, linkage disequilibrium, Hardy-Weinberg equilibrium, haplotypes and multiple logistic regression. In conclusion, the present study showed that the presence of polymorphisms isolated and in haplotype influences the osseointegration process. The SNPs MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) and MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307), individually influence implant loss, while the SNPs MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393) and MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242), are not isolated risk factors for osseointegrated implant loss. Analysis of the haplotypes of the MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) suggests that the T-A-GG-5A haplotype represents a risk factor, whereas the C-A-G-6A and C-G-G-6A haplotypes have a protective effect. The elucidation of the role of MMPs SNPs in the loss of dental implants contributes to a better understanding of the osseointegration process and may contribute to the recognition of patients at risk and to assist in the development of strategies for modulating genetic markers and to ensure adequate and individualized treatment.

**Keywords:** Metalloproteinases, Polymorphisms, Osseointegration, Risk factor, Dental Implant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b>	LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NOS CROMOSSOMOS: 11q22.2 (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), 11q22.3 (MMP-3), 16:q12.2 (MMP-2), 20q13.12 (MMP-9) E 14:q11.2 (MMP-14).	20
<b>FIGURA 2-</b>	REPRESENTAÇÃO GERAL DA ESTRUTURA DE UMA METALOPROTEINASE DA MATRIZ (MMP).	20

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	CONDIÇÕES GERAIS PARA REALIZAÇÃO DE PCR E RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS GENES DA MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307).	33
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1 –</b>	CLASSIFICAÇÃO E SUBSTRATOS PRIMÁRIOS, TECIDOS EXPRESSOS E MOLÉCULAS ATIVADORAS E ATIVADAS PELAS METALOPROTEINASES DESTE ESTUDO.	23
-------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico
<b>MMPs</b>	- Metaloproteinases
<b>PCR</b>	- Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>RFLP</b>	- Polimorfismo do Comprimento de Fragmento(s) de Restrição ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>SNPs</b>	- Polimorfismos de Nucleotídeo Único ( <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> )

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
2.1	IMPLANTES DENTAIS OSSEOINTEGRADOS	15
2.2	METALOPROTEINASES	19
2.3	POLIMORFISMOS GENÉTICOS, IMPLANTES DENTAIS E MMP	26
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	30
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
4.1	OBTENÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DO EPITÉLIO BUCAL	32
4.2	GENOTIPAGEM	32
4.3	ELETROFORESE	33
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
<b>5.</b>	<b>CAPÍTULO I - ARTIGO PUBLICADO: ANALYSIS OF MMP-3 POLYMORPHISM IN OSSEOINTEGRATED IMPLANT FAILURE</b>	35
<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO II - ARTIGO PUBLICADO: MATRIX METALLOPROTEINASES GENE POLYMORPHISM HAPLOTYPE IS A RISK FACTOR TO IMPLANT LOSS: A CASE-CONTROL STUDY</b>	40
<b>7.</b>	<b>CAPÍTULO III - ARTIGO PUBLICADO: MMP-13 POLYMORPHISMS AS A RISK FACTOR IN EARLY IMPLANTS LOSS</b>	47
<b>8.</b>	<b>CAPÍTULO IV - ARTIGO EM PROCESSO DE SUBMISSÃO: ROLE OF MMP-2 AND MMP-9 IN DENTAL IMPLANT LOSS</b>	52
<b>9.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	62
<b>10.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	65
	<b>REFERÊNCIAS</b>	66
	<b>ANEXO I- PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO, EMITIDO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/SD), DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.</b>	83
	<b>ANEXO II- IMAGEM DOS GÉIS DE ELETROFORESE COM OS PADRÕES DE BANDA DOS GENÓTIPOS, APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA (RFLP), CORADOS COM GEL RED, PARA MMP-1 g.-1607 G&gt;GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A&gt;G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C&gt;T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A&gt;G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A&gt;6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C&gt;T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C&gt;T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T&gt;C (rs2236307).</b>	90
	<b>ANEXO III- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS GENES DA MMP-1 g.-1607 G&gt;GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A&gt;G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C&gt;T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A&gt;G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A&gt;6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C&gt;T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C&gt;T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T&gt;C (rs2236307) NOS GRUPOS CASO E CONTROLE.</b>	91
	<b>ANEXO IV- MODELOS ANALISADOS NA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA PARA OS GENES MMP-1 g.-1607 G&gt;GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A&gt;G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C&gt;T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A&gt;G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A&gt;6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C&gt;T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C&gt;T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T&gt;C (rs2236307) NOS GRUPOS CASO E CONTROLE</b>	92



## 1. INTRODUÇÃO

As evidências clínicas da osseointegração revolucionaram a implantodontia, tornando os implantes dentais osseointegrados a alternativa mais utilizada para substituir dentes naturais em diversas situações de edentulismo.

O tratamento com esse tipo de implante tem sido amplamente utilizado. Apesar de apresentar resultados previsíveis, reprodutíveis e estáveis garantindo um alto índice de sucesso, falhas ainda ocorrem. A literatura relata uma taxa global de 1,9 - 3,6% de perda de implantes (PINTO et al., 2000; HOLM-PEDERSEN et al., 2007; BUSER et al., 2017). Devido ao aumento constante do uso desse procedimento nos últimos anos em todo o mundo, essa pequena porcentagem mostra-se significativa diante do número de casos, e torna a perda e complicações relacionadas ao implante cada vez mais frequentes.

A etiologia da perda do implante é um processo multifatorial e vários fatores extrínsecos e intrínsecos têm sido propostos para explicá-lo, como tabagismo, contaminação bacteriana, erros técnicos, superaquecimento do osso durante o procedimento de instalação, inflamação exacerbada, doenças sistêmicas pré-existentes, entre outros (CHRCANOVIC et al., 2014; GEHRKE et al., 2014; MAY et al., 2016). No entanto, em alguns casos, a causa e o mecanismo da falha do implante ainda são obscuros.

A osseointegração é um processo complexo e dinâmico, no qual células ósseas sintetizam e liberam diversas citocinas e mediadores lipídicos, incluindo metaloproteinases de matriz (MMPs), que medeiam à osteogênese e à inflamação durante a osseointegração dos implantes dentais.

As MMPs são enzimas endopeptidases, secretadas de forma altamente regulada pelas células locais, capazes de degradar praticamente toda a matriz extracelular e seus componentes. Suas atividades biológicas influenciam criticamente o comportamento celular, as vias de sinalização e o sistema imune devido à diversidade de alvos de degradação e/ou as suas atividades proteolíticas. O desbalanceamento dessas enzimas pode comprometer a regeneração e a homeostase do tecido periimplantar e, nessas circunstâncias, a remodelação dá lugar a um processo de reparo, com destruição tecidual, inflamações exacerbadas e formação de uma cápsula de tecido conjuntivo, acarretando a instabilidade e mobilidade do implante e, conseqüentemente, a necessidade de removê-lo (CLARK,

1996; STERNLICHT; WERB, 2001; BUTLER; OVERALL, 2009; DEMIDOVA-RICE et al., 2012; PESCE et al., 2013; INSUA et al., 2017).

Alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem afetar os níveis de expressão gênica e a produção ou funções de proteínas; consequentemente, influenciam a osteogênese e as respostas inflamatórias. Alguns SNPs em genes de citocinas e mediadores lipídicos, inclusive MMPs, já foram associados à perda de implantes e periimplantite (SEYMOUR et al., 1989; ESPOSITO et al., 1998; NISHIOKA et al., 2000; TREVILATTO; LINE, 2000; GREENSTEIN; HART, 2002; SANTOS et al., 2004; AIDAR; LINE, 2007; LEITE et al., 2008; MONTES et al., 2009; DIRSCHNABEL et al., 2011; DEREKA et al., 2012; COSTA-JUNIOR et al., 2013; LIAO et al., 2014; PIGOSSI et al., 2014; CASADO et al., 2015; COSYN et al., 2016; MUNHOZ et al., 2016; ALEKSANDROWICZ et al., 2017; PETKOVIC-CURCIN et al., 2017; LIN et al., 2018).

É importante ainda investigar a contribuição de haplótipos, conjunto de SNPs que tendem a ocorrer sempre juntos, e que estão associados, estatisticamente a osseointegração. A literatura não relata estudos avaliando o papel de haplótipos genéticos na perda de implante. Entretanto, os haplótipos mostram uma maior probabilidade de exercer efeitos em determinado processo devido ao desequilíbrio de ligação destes como uma variante causal desconhecida. Também é possível que a ação sinérgica de diferentes SNPs aumente o risco de perda de implantes.

Um dos desafios atuais da implantodontia está na habilidade de detectar pacientes de risco e desenvolver estratégias de prevenção individualizadas. Portanto, o conhecimento de fatores genéticos associados ao risco de perda precoce de implante, nos parece importante. Considerando tudo isso, a análise dos alelos e do haplótipo das MMPs são de grande valor para o entendimento da falha na osseointegração.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPLANTES DENTAIS OSSEOINTEGRADOS

No ano de 1969, Branemark e sua equipe desenvolveram um protocolo clínico detalhado a respeito de um novo tipo de implantes dentais, baseado na conexão direta com o tecido ósseo, conhecido hoje como implante dental osseointegrado. A descoberta do fenômeno da osseointegração e sua aplicação em Odontologia, na qual o biomaterial é incorporado ao osso vivo, foi um dos mais significativos avanços no tratamento para repor dentes naturais únicos, arcos parcialmente e/ou completamente desdentados (BRANEMARK, 1969). Os implantes dentais osseointegrados têm sido amplamente utilizados, pois, aliam estética e função, apresentam resultados previsíveis, reproduzíveis, estáveis ao longo do tempo, com alto índice de sucesso no tratamento (PINTO et al., 2000; HOLM-PEDERSEN et al., 2007; BUSER et al., 2017).

Os parafusos utilizados nos implantes são produzidos de materiais aloplásticos inertes comumente feitos de titânio, titânio com zircônio, entre outros (NALLASWAMY et al., 2003; HASAN, 2012). Apresentam inúmeras características: quanto ao formato, a topografia, ao tratamento da superfície, ao tamanho e ao tipo de instalação entre outros diversos modelos disponíveis a escolha do profissional (YESHWANTE et al., 2015; TAMIMI, 2015).

Durante o procedimento cirúrgico de colocação do implante, o tecido ósseo é perfurado com a utilização de uma broca de perfuração e o parafuso inserido através de torque mecânico no osso alveolar maxilar e/ou mandibular, de modo a ficar firme e estável, garantindo a chamada estabilidade primária. Já a estabilidade secundária ocorre durante a cicatrização do tecido e envolve reabsorção e remodelação óssea, culminando na integração da interface osso-implante (FRIBERG et al., 1991; ESPOSITO et al., 1998; DOTTORE et al., 2014).

Apesar de procedimentos bem-sucedidos, avanços na área de biomateriais e aperfeiçoamento nos tratamentos de superfície dos implantes terem levado a maioria dos procedimentos a alcançarem a osseointegração com sucesso, falhas ainda ocorrem, cuja taxa global é em torno de 1,9-3,6% (HOLM-PEDERSEN et al., 2007; BUSER et al., 2017). Falhas podem ocorrer de forma tardia, principalmente proveniente de processos patológicos atrelados ao estado de saúde geral do paciente e eventos sistêmicos de risco, como diabetes, artrite, obesidade,



osteoporose, hábito tabagista, radioterapia, sobrecarga e periimplantite retrógrada (ESPOSITO et al., 1998; EKFELDT et al., 2001; DOTTORE et al., 2014; LEE et al., 2016; KATE et al., 2016). Por outro lado, a perda pode ocorrer de forma precoce, até seis meses após a colocação do implante no osso, cujo comprometimento é mais associado a complicações cirúrgicas, volume e qualidade óssea inadequada, infecções pós-cirúrgicas, inflamação excessiva, perda óssea marginal, contaminação bacteriana e osseointegração incompleta (ESPOSITO et al., 1998; EKFELDT et al., 2001; PAQUETTE et al., 2006; NORTON, 2006; TRAINI et al., 2010; DOTTORE et al., 2014; LEE et al., 2016; KATE et al., 2016).

Mesmo com todos os cuidados clínicos e exames prévios, existem alguns pacientes que desenvolvem repetidas perda do implante sem causa clinicamente reconhecida, sugerindo uma incapacidade na remodelação (EAS et al., 2002; HASAN, 2012; COSTA et al., 2014; YESHWANTE et al., 2015). Dessa maneira, parece existir um grupo de risco, indicando que fatores intrínsecos ao indivíduo, inclusive fatores genéticos, desempenham papel importante na sobrevivência dos implantes osseointegrados e que podem estar influenciando a resposta durante a osseointegração.

A pesquisa molecular aplicada a implantes dentais teve seus primeiros relatos no final de 1990 (WAKABAYASHI et al., 1997; TAMURA et al., 1997). Desde então, houve avanço significativo nos estudos relacionados ao interesse na susceptibilidade genética para o fenótipo clínico de perda do implante. Alguns estudos têm sido baseados na análise de genes candidatos, com o objetivo de encontrar marcadores genéticos e associação entre alelos e/ou genótipos específicos e susceptibilidade à falha do implante (SANTOS et al., 2004; ALVIM-PEREIRA et al., 2008; PIGOSSI et al., 2014; DE ARAUJO MUNHOZ et al., 2018).

A análise de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), o tipo mais comum de variação na sequência de DNA, tem se mostrado de grande valia, tem sido associado à ocorrência e/ou desenvolvimento de diversas doenças, inclusive à perda do implante (CHEN et al., 2011).

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo, ativo e altamente vascularizado, cuja matriz extracelular mineralizada é composta por fibras colagenosas, especialmente colágeno do tipo I. Os monômeros da sua estrutura básica formam feixes de fibrilas que, combinados com outros tipos de colágeno e/ou moléculas não colágenas, formam estruturas como as membranas basais, os



ligamentos, os tendões, a córnea, a pele, os vasos sanguíneos e os ossos (ZELTZ et al., 2014; ORGEL et al., 2014; DUTOV et al., 2016). Realmente, as estruturas que compõem a matriz óssea desempenham papel importante na organização macromolecular e sinalização celular, permitem a ancoragem da estrutura implantar e o suporte de carga funcional após a completa osseointegração (ASHKIN et al., 1986; VELEGOL; LANNI, 2001; DUTOV et al., 2016).

A osseointegração é um processo complexo e dinâmico, que ocorre via osteogênese de contato, onde a superfície do implante é povoada por células ósseas para formar o novo osso; e por osteogênese à distância, em que a formação óssea é precedida pela reabsorção do tecido existente - osteoclastogênese. Estudos recentes sugerem que a osteogênese de contato é dependente de fatores desencadeantes produzidos durante a osteogênese à distância (CHOI et al., 2017), os quais medeiam a formação do novo osso e os processos inflamatórios durante a osseointegração, muito similar à cicatrização óssea primária. Após o trauma cirúrgico, inicia-se uma resposta inflamatória à lesão, na qual uma cascata de mediadores promove alterações circulatórias e formação de um hematoma. Durante o processo inflamatório, são liberados numerosos mediadores químicos e enzimáticos como diversas interleucinas, fator de transformação do crescimento beta, fator de necrose tumoral, fatores transformadores de crescimento do endotélio vascular, metaloproteinases da matriz e outros, que irão influenciar cada fase subsequente do processo normal de remodelação e cicatrização (GREENSTEIN; HART, 2002; AMERIO et al., 2002; HU et al., 2010; INSUA et al., 2017). Em uma terceira etapa, ocorre a maturação da ferida por mecanismo de remodelação óssea, a qual é influenciada pelas pressões oclusais (COTRAN et al., 1999).

Quando há regeneração adequada, é estabelecido o contato direto entre a superfície do implante e o tecido ósseo. Porém, quando no lugar da regeneração acontece um processo de reparo, o local exibe inflamação exacerbada ou prolongada, característica de feridas que não cicatrizam (DEMIDOVA-RICE et al., 2012; PESCE et al., 2013). Verifica-se a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo no local, onde citocinas como interleucinas e fatores de crescimento transformante orientam a migração e proliferação de fibroblastos, culminando com a substituição do tecido de granulação, inicialmente formado, por uma cicatriz avascular composta por fibroblastos fusiformes, colágeno denso, fragmentos de

tecido elástico e outros componentes da matriz extracelular (COTRAN et al., 1999; DEMIDOVA-RICE et al., 2012; PESCE et al., 2013). Essas citocinas ainda sinalizam para diversos tipos celulares, estimulando a produção de prostaglandina e MMPs (GREENSTEIN; HART, 2002). As MMPs são a principal classe de enzimas capazes de clivar todos os substratos da matriz extracelular, regular o comportamento celular e as vias de sinalização durante a remodelação do tecido (PAIVA; GRANJEIRO, 2014), inclusive na osseointegração do implante.

A causa exata e o mecanismo de falha precoce do implante ainda são incertos. Uma resposta imunoinflamatória anormal, envolvendo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais, osteoclastos e osteoblastos, pode destruir o tecido periodontal e periimplantar (SEYMOUR et al., 1989). Logo, na etiologia da falha implantar ocorre um processo de reparo, sendo que a inflamação exacerbada e formação de uma cápsula de tecido conjuntivo promovem a mobilidade do implante e, conseqüentemente, a necessidade de removê-lo.

De acordo com Negm (2016) o sucesso do implante envolve implantes funcionais e esteticamente satisfatórios. Todos que não são funcionais, mas ainda estão na boca no momento do exame, independentemente do estado da prótese ou da satisfação do paciente, são apenas considerados como sobreviventes.

A osseointegração bem sucedida é indispensável para implantes dentais funcionais. A quantidade e a qualidade do osso interfacial são fatores importantes para a estabilidade biológica periimplantar, tais características, estão intimamente ligadas aos componentes moleculares da matriz extracelular. Qualquer modificação ou destruição descontrolada causada pela atividade enzimática das MMPs aos componentes matriciais podem comprometer a osseointegração. As MMPs são secretadas pelas células locais e são participantes ativas da destruição tecidual durante o processo inflamatório e de remodelação (FRIBERG et al., 1991; HUTTON et al., 1995; MOUHYI et al., 2009; SAKKA; COULTHARD, 2011; GEHRKE et al., 2014; LI et al., 2017; LEE et al., 2018). O conhecimento do papel das MMPs na osseointegração parece ser essencial para a real compreensão de perda de implantes.

## 2.2 METALOPROTEINASES

Entre as inúmeras moléculas importantes envolvidas no processo de osseointegração, as MMPs merecem especial destaque. Estão envolvidas em muitos e diversificados processos fisiológicos e patológicos, suas propriedades enzimáticas fazem delas um tópico de pesquisa essencial na osseointegração devido sua presença em inflamações orais e remodelação óssea (SHINKARENKO et al., 2013; NISSINEN; KAHARI, 2014).

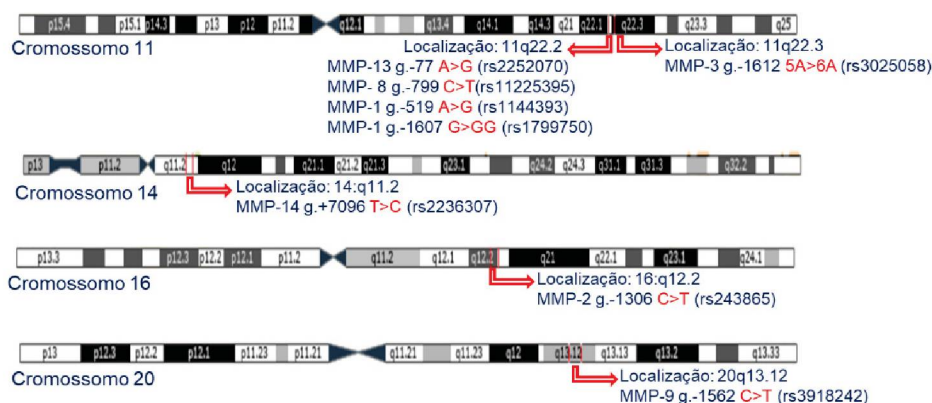
As MMPs desempenham papel vital na proteólise de componentes estruturais e de sinalização da matriz extracelular, sua atividade influencia a diferenciação, migração, invasão e proliferação celular (ITOH; SEIKI, 2006; CAUWE et al., 2007; WENG; YEN, 2010; LIU et al., 2010; HU et al., 2010; PAIVA; GRANJEIRO, 2014).

Tais enzimas têm a capacidade de degradar praticamente toda a matriz extracelular, membrana basal e seus componentes como colágenos, fibronectina, laminina, vitronectina e outras (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; CAUWE et al., 2007); além de atuar sobre substratos diferentes dos matriciais, incluindo importantes fatores de crescimento, proteínas biologicamente ativas como citocinas e quimosinas, moléculas de adesão celular e muitos outros tipos de receptores e glicoproteínas residentes na superfície celular (STERNLICHT; WERB, 2001; CHANG et al., 2001; BUTLER; OVERALL, 2009; GORMAN et al., 2011; CHANG; WERB, 2011). De fato, as MMPs possuem papel importante na regulação da homeostase da matriz extracelular e estão relacionadas diretamente ao processo de osseointegração (MOTT; WERB, 2004).

MMPs são amplamente distribuídas no organismo e sua forma estrutural é bastante conservada (MCGEEHAN et al., 1992; CHAKRABORTI et al., 2003). Todas elas possuem uma sequência gênica com alta taxa de similaridade, sugerindo que foram duplicadas a partir de um gene ancestral comum. Dos genes das MMPs humanas, oito estão no cromossomo 11. Outros genes que as sintetizam estão distribuídos entre os cromossomos 1, 8, 12, 14, 16, 20 e 22 (SHAPIRO, 1998). Os genes das MMPs deste estudo, estão localizados nos cromossomos 11q22.2 (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), 11q22.3 (MMP-3), 16:q12.2 (MMP-2), 20q13.12 (MMP-9) e 14:q11.2 (MMP-14) (<https://www.ensembl.org/HomoSapiens/Location>; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) (FIGURA 1).



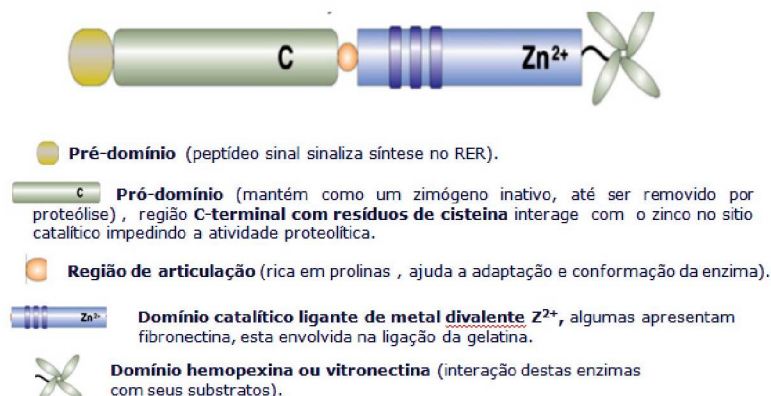
FIGURA 1- LOCALIZAÇÃO DOS SNPS NOS CROMOSSOMOS: 11q22.2 (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), 11q22.3 (MMP-3), 16:q12.2 (MMP-2), 20q13.12 (MMP-9) E 14:q11.2 (MMP-14).



FONTE: Adaptado de <https://www.ensembl.org/homosapiens/location>;  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

A família das MMPs inclui 28 membros, que podem ser classificados com base na especificidade do substrato e na homologia da sequência, como gelatinases, collagenases, estromelinas, MMPs da membrana e matrilisinas, (STERNLICHT; WERB, 2001; GROBLEWSKA et al., 2012; HERSZÉNYI et al., 2012). A estrutura das MMPs deriva de um protótipo de três a cinco domínios e tem pelo menos um pró-domínio com região C terminal rico em cisteína, que mantém a enzima como um zimógeno inativo até que seja removido por proteólise; um domínio de articulação rico em prolinas; e um domínio Hemopexina/Vitronectina, que medeia a interação entre a enzima e seus inibidores teciduais (TIMPs) e aos receptores celulares (WOESSNER; NAGASE, 1999; HADLER-OSLEN et al., 2011) (FIGURA 2).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO GERAL DA ESTRUTURA DE UMA METALOPROTEINASE DA MATRIZ (MMP).



FONTE: MUNHOZ, 2014.

A maioria das MMPs são sintetizadas e secretadas na forma inativa (zimógenos). A ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação por proteases que ocorre pela interação com diferentes moléculas como por citocinas, hormônios, fatores de crescimento, interação com inibidores proteolíticos, como a  $\alpha$ 2-macroglobulina (proteína plasmática que age como um inibidor de proteases) ou estresse de cisalhamento ou oxidativo (WOESSNER, 1991; MATRISIAN, 1992; SPINALE, 2007; LENGLET et al., 2015).

Embora várias questões permaneçam em aberto, parece seguro pensar que as MMPs são rigorosamente controladas durante todos os aspectos da sua longevidade biológica, desde a indução até a sua destruição final, com pelo menos três pontos críticos: síntese-secreção, ativação e inibição (SOUZA, 2013).

Inicialmente, julgava-se que a maquinaria proteolítica celular se dedicava fundamentalmente ao reconhecimento e eliminação de proteínas que estivessem decompostas ou incorretamente conformadas. Porém, os progressos alcançados por estudos nesta área demonstraram papéis adicionais para a proteólise controlada numa grande variedade de importantes processos biológicos. Em particular, a da modulação do microambiente extracelular através das MMPs em processos fisiológicos normais (CHANG et al., 2013) como no desenvolvimento embrionário, na involução uterina pós-parto, na remodelação óssea, na cicatrização de feridas (WOESSNER, 1991), na angiogênese (NEWBY, 2005; QI et al., 2018; ABU EL-ASRAR et al., 2018), na reposição celular, na remielinização, restabelecimento de conectividade e integridade neurovascular (HUNTLEY et al., 2012), entre outras.

Sabe-se que as MMPs são rigorosamente reguladas aos níveis transcricional, traducional e pós traducional (STERNLICHT; WERB, 2001) e alterações em sua expressão e atividade foram associados a diversos processos patológicos, crescimento e expansão de tumores benignos e metástases (BASSET et al., 1997, JOHNSEN et al., 1998; EGEHLAD; WERB, 2002; YANG et al., 2013), neoplasias primárias (ZHOU et al., 2010; PARK et al., 2011; WU et al., 2011), câncer colorretal, de próstata e mama (SHALABY et al., 2014; SAEED et al., 2013a, 2013b; SCHVEIGERT et al., 2013;).

As MMPs estão associadas como inflamação por meio da migração leucocitária (KNAUPER et al., 1993), à colite (MADISCH et al., 2011), artrite reumatoide (YE et al., 2007; SUN et al., 2013), osteoartrite (BARLAS et al., 2009), neuroinflamação, isquemia e hipóxia (RIVERA et al., 2010), traumatismo cerebral e



espinhal, lesão medular, degeneração neuronal e isquemia cerebral (ZHANG et al., 2010; CHEHAIB et al., 2014; NIE et al., 2014), diabetes tipo 2 (SINGH et al., 2013). Além de cardiomiopatia hipertrófica (PRIVALOVA et al., 2014), doença arterial coronariana (WU et al., 2013), fibrilação atrial persistente (LOMBARDI et al., 2011), doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (HE et al., 2013), reabsorção óssea (OKADA et al., 1995), entre outras distintas patologias em diferentes órgãos.

Na cavidade oral alterações nas MMPs já foram relacionadas a câncer bucal (PEREIRA et al., 2012; LI et al., 2018; TSAI et al., 2018), periodontite (ASTOLFI et al., 2006; LI et al., 2012; PAN et al., 2013; HERNÁNDEZ-RÍOS et al., 2016), lesões de cárie (SORSA et al., 2004; KARAYASHEVA et al., 2016) e falhas na osseointegração (SANTOS et al., 2004; LEITE et al., 2008; COSTA-JUNIOR et al., 2013; PAIVA; GRANJEIRO, 2014; DE ARAUJO MUNHOZ et al., 2018), demonstrando a importância dessas enzimas no ambiente oral.

A maioria das MMPs possuem propriedades e substratos de grande importância para a implantodontia, pois estão presentes no fluido periimplantar e parecem influenciar a osseointegração. Estudos já demonstraram que os níveis e formas moleculares das MMPs no fluido sulcular podem desempenhar papel relevante na perda óssea e em processos inflamatórios de perimucosite e/ou periimplantite (KIVELÄ-RAJAMÄKI et al., 2003, SORSA et al., 2006; COSTA et al., 2010; THIERBACH et al., 2016; ALEKSANDROWICZ et al., 2017; GHIGHI et al., 2018), dessa forma potencialmente influenciam na falha durante o processo de osseointegração.

Nesse estudo selecionamos diferentes tipos de MMPs entre elas três collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13); uma estromelina (MMP-3), duas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e uma MMP de membrana (MMP-14 ou MT-1MMP). Elas possuem substratos e expressão em diversos tecidos comuns, e são capazes de ativar e serem ativadas por inúmeras moléculas não matriciais, além de algumas delas serem ativadas por outras MMPs, inclusive das aqui estudadas. Os substratos primários, tipos celulares que expressam e as moléculas ativadoras e ativadas pelas MMPs deste estudo encontram-se ressumadas no QUADRO 1.

QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO E SUBSTRATOS PRIMÁRIOS, TECIDOS EXPRESSOS E MOLÉCULAS ATIVADORAS E ATIVADAS PELAS METALOPROTEINASES DESTE ESTUDO.

Enzima	Substratos	Expresso por	Ativação
MMP-1 ou Colagenase-1	colágeno I, II, III, VII, VIII, X, agrecan, entactina, gelatina, L-selectina, MBP, precursor de TNF, serpinas, versican, $\alpha$ -2 macroglobulina.	condrócitos, fibroblastos, macrófagos, hepatócitos, osteoblastos e queratinócitos.	Ativado por: MMP-3, -10, calicrein, plasmina, quinase.  Ativador de: MMP-2
MMP-8 ou Colagenase-2	colágeno I, II, III, VII, VIII, X, agrecan, fibronectina, gelatina, laminina, serpinas, $\alpha$ -2 macroglobulina.	neutrófilos.	Ativado por: MMP-3, -10, plasmina.
MMP-13 Ou Colagenase-3	colágeno I, II, III, IV, IX, XIV, agrecan, fibrilina, fibronectina, gelatina, laminina, perlecan, serpinas, tenascinas.	fibroblastos, osteoblastos, osteócitos e queratinócitos.	Ativado por: MMP-2, -3, -10, -14, -15, plasmina  Ativador de: MMP-2 e -9
MMP-3 ou Estromelisin-1	colágeno III, IV, V, IX, X, agrecan, elastina, entactina, fibrilina, fibronectina, gelatina, laminina, MBP, nidogenio, precursor de TNF, perlecan, tenascina, versican.	condrócitos, fibroblastos, glândula mamária, macrófagos, neutrófilos e queratinócitos.	Ativado por: calicreina, cathepsina G, elastase, plasmina, quinase, triptase,  Ativador der: MMP-1, -8, -9, -13
MMP-2 ou Gelatinase A	colágeno I, IV, V, VII, IX, X, XIV, agrecan, elastina, fibrilina, fibronectina, gelatina, laminina, MBP, precursor do TNF, tenascina, versican, vitronectina, $\alpha$ -2macroglobulina.	condrócitos, fibroblastos, glândula mamária, macrófagos, osteoblastos, osteócitos, polimorfonuclear, monócitos e queratinócitos.	Ativado por: MMP-1, -3, -7, -13, -14, -15, -16, -24.  Ativador de: MMP-9 e -13
MMP-9 ou Gelatinase B	colágeno IV, V, VII, X, XIV, agrecan, angiostatina, elastina, entactina, fibrilina, fibronectina, gelatina, MBP, precursor do TNF, versican, vitronectina, $\alpha$ -21 antitripsina, $\alpha$ -2macroglobulina.	condrócitos, fibroblastos, macrófagos, monócitos, osteoblastos, osteoclastos, polimorfonucleares e queratinócitos.	Ativado por: MMP-2, -3, -13, plasmina.
MMP-14 ou (MMP de Membrana 1 -MT1-MMP)	colágeno I, II, III, gelatina, agrecan, fibrilina, fibronectina, furina, laminina, perlecan, plasmina, tenascina, vitronectina.	condrócitos, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e queratinócitos.	MMP-2, -9, -13.

FONTE: Adaptado de SOUZA, 2013; MACIEJCZYK et al., 2016.

A MMP-1 (colagenase-1) é uma importante proteinase da família MMP que degrada principalmente o colágeno tipo I, a proteína mais abundante no corpo. A MMP-1 é crítica para a remodelação da matriz extracelular e a literatura já demonstrou seu envolvimento na inflamação crônica na polpa dental (EVROSIMOVSKA et al., 2012), na patogênese das lesões inflamatórias periapicais (HADZIABDIC et al., 2016), no câncer bucal (LI et al., 2018), na inflamação gengival severa (NASCIMENTO et al., 2019) e na falha na osseointegração de implantes dentais (SANTOS et al., 2004; LEITE et al., 2008).

A MMP-8 desempenha papel especial na inflamação e em processos destrutivos no periodonto, tendo em vista que os substratos de preferência dessas enzimas são os tipos de colágeno I, II, III e IV, importantes proteínas do aparato de ligação periodontal e dos tecidos moles ao redor dos implantes (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; SORSA et al., 2006). Estudos indicaram que os níveis de MMP-8 são significativamente maiores no fluido gengival crevicular (CHEN et al., 2000; RAI et al., 2008; MARCACCINI et al., 2010; KONOPKA et al., 2012; HERNÁNDEZ-RÍOS et al., 2016; GÜRSOY et al., 2018). Aleksandrowicz e colaboradores (2017) sugerem o monitoramento do nível de MMP-8 no fluido sulcular periimplantar (PISF) poderia ajudar a diagnosticar a mucosite e/ou periimplantite em estágio inicial, antes das manifestações clínicas, fato que permitiria o início rápido da terapia apropriada. Além disso, a MMP-8 é citada como uma forte candidata a biomarcador para detectar destruição óssea alveolar em periodontite (GURSOY et al., 2013) e perda óssea progressiva na periimplantite (ARAKAWA et al., 2012).

Outra enzima crucial na degradação dos componentes da matriz é a MMP-13, capaz de degradar especialmente colágenos fibrilares, componente essencial na formação de nova matriz óssea e integração da superfície do implante ao osso circundante (MACIEJCZYK et al., 2016). A influência da MMP-13 não é apenas na migração de células epiteliais em repouso, mas também na invasão de células estromais no tecido granulomatoso, que pode culminar na conversão de granuloma periapical com epitélio em cisto radicular (BHALLA et al., 2014). Existe uma correlação direta do aumento da expressão de MMP-13 com vários parâmetros clínicos e histológicos na gravidade da periodontite crônica (ŞURLIN et al., 2014; NAGASUPRIYA et al., 2014), no aumento gengival e deformação da raiz em um novo tipo de fibromatose gengival (KANG et al., 2018), nas lesões periapicais



(ANDRADE et al., 2017), no líquen plano oral e carcinoma epidermóide oral (NOSRATZEHI et al., 2017).

A MMP-3 é um membro chave da família de estromelisina, apresenta ampla especificidade de substrato, bem como a potência de auto ativação de pró-MMP-3 e de ativação de outras MMPs, como pró-MMP -1, -8 , -9 e -13 (MATRISIAN et al., 1992; BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993; SAMNEGARD et al., 2005; SHALIA et al., 2010). A MMP-3 esta significativamente associada a doenças orais (ESCALONA et al., 2016) e alterações no nível dessa enzima parecem estar associados ao aumento da suscetibilidade a cáries (KARAYASHEVA et al., 2016), ao líquen plano oral e carcinoma epidermóide oral (AGHA-HOSSEIN et al., 2015).

Dentro da classe das MMPs, o envolvimento das gelatinases, MMP-2 e MMP-9, foram documentados na remodelação da matriz no processo de cicatrização de feridas e destruição do tecido conjuntivo (HERNÁNDEZ-PÉREZ, et al., 2012; MACIEJCZYK et al., 2016; PATRUNO et al., 2018). Produzidos por fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares e osteoclastos, compartilham especificidades de substratos, atuam sobre citocinas e quimiocinas envolvidas em processos inflamatórios, bem como ativam outras moléculas reguladoras de substratos não bioativos, clivam suas formas biológicas inativas e interferem no metabolismo ósseo local (LIU et al., 2010; MACIEJCZYK et al., 2016; PATRUNO et al., 2018). Essas gelatinases estão intimamente envolvidas na remodelação periodontal (INGMAN et al., 1994), na periodontite crônica (ŞENTÜRK et al., 2018) e na progressão da periodontite apical (BARREIROS et al., 2018).

A MMP-2 é considerada responsável pelo início da degradação da membrana basal e matriz extracelular, principalmente do colágeno tipo IV (BHAKHAR; BHAVSAR, 2017), o que pode explicar o fato dessa enzima estar associada ao câncer bucal (TSAI et al., 2018) e de que o aumento no nível de sua expressão amplia a capacidade invasiva de células neoplásicas (SINGH et al., 2010). Já a MMP-9 representa uma das proteases mais abundantes expressas por osteoclastos, também tem a capacidade de degradar componentes da membrana basal, como colágeno tipo IV e fibronectina (FREIJE et al., 2003; RAMOS-FERNANDEZ et al., 2011) e o aumento de sua expressão e a ativação estão relacionados com a progressão e a invasão do carcinoma oral (LAHDENTAUSTA et al., 2018) e o agravamento das lesões orais causadas por líquen plano (WANG et al., 2018). As MMP-9 estão fisiologicamente envolvidos na reorganização tecidual e

no metabolismo ósseo (CORBEL et al., 2000; DELAISSÉ et al., 2000; LOGAR et al., 2007; BOLTON et al., 2009). Uma vez ativada, a MMP-9 cliva substratos específicos, como moléculas de adesão e receptores de superfície celular (VAFADARI et al., 2016).

A MMP-14 (MMP da membrana tipo-MT1-MMP), desempenha papel de collagenase diretamente contra os componentes da matriz extracelular (FURUYA et al., 2001), além de forma um complexo trimolecular com inibidor tecidual de MMP-2 (TIMP-2) e pro-MMP-2 na superfície celular (OHNISHI et al., 1998; ITOH; SEIKI, 2006; CHEN et al., 2011). Desta forma, atuam em um microambiente pericelular tridimensional restrito de colágeno ou fibrina. A MMP-14 tem sua expressão aumentada em câncer bucal (BARBOLINA et al., 2007; CHEN et al., 2011; WENG et al., 2012). Sua capacidade de ativação de outras MMPs, como pró-MMP-2 -9 e -13, por meio de atividades combinadas, promove degradação, remodelação tecidual, invasão e metástase (KNÄUPER et al., 2002; TOTH et al., 2003; NISHIDA et al., 2008).

Observa-se o envolvimento de diferentes MMPs em múltiplas doenças orais, parecendo promissores utilizar-las como biomarcadores. A multiplicidade de MMPs com funções sobrepostas serve provavelmente para garantir o controle regulatório dessas enzimas, mas apesar desta redundância ser vantajosos para o organismo, podem gerar forte discussão e dúvida na compreensão de seu comportamento *in vivo* (SOUZA, 2013). Embora várias questões permaneçam em aberto, parece seguro pensar que as MMPs desempenham papel chave na osseointegração.

## 2.3 POLIMORFISMOS GENÉTICOS, IMPLANTES DENTAIS E MMPs

Em condições normais proteinases como as MMPs, são secretadas e/ou ancoradas à superfície da membrana plasmática das células, focando sua atividade catalítica em substratos específicos dentro do espaço pericelular (CHAKRABORTI et al., 2003). As interações específicas entre as células e as MMPs por meio de receptores, produzem um sinal que adverte a célula sobre o ligante encontrado e sinaliza sobre qual proteinase deve ser secretada, bem como onde e quando essa secreção deve ocorrer (CHAKRABORTI et al., 2003). A expressão e atividade de cada MMP específica, no geral, são confinadas à localização específica em um tecido ativado.



De modo geral, a regulação da expressão é extremamente regulada, porém, em alguns casos, modificações que ocorrem em certos nucleotídeos, principalmente nas regiões promotoras dos genes, ou seja, polimorfismos genéticos podem influenciar a regulação transcricional, conseqüentemente, alterar a quantidade de MMPs secretada pela célula local (CARGILL et al., 1999).

Polimorfismos são variações genéticas nas quais um ou mais alelos tem frequência gênica maiores que 1% na população (THOMPSON et al., 1991). Aproximadamente 90% dos polimorfismos de DNA são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs- *Single Nucleotide Polymorphisms*), devido à troca, inserção ou deleção de uma única base (RA; PARK, 2007). Embora a maioria dos polimorfismos de DNA seja funcionalmente neutro, uma parte deles pode exercer efeito alelo específico na regulação da expressão gênica ou função das proteínas codificadas, e assim tornar um indivíduo mais ou menos suscetível a determinada patologia (YE et al., 2000), inclusive associados a processos fisiológicos e patológicos bucais.

Conforme citado anteriormente, o principal componente da matriz orgânica do tecido ósseo é o colágeno, sendo assim, as MMPs desempenham papel importante da degradação e remodelação dos ossos durante o processo de osseointegração. Dessa forma, o comprometimento da regulação e expressão dessas enzimas pode trazer conseqüências importantes durante a osseointegração.

Diferentes SNPs já foram descritos em MMPs, e alguns deles foram associados com patologias bucais. Entre eles o SNP MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750) no gene da collagenase-1, já foi está relacionado à perda precoce do implante dental, sendo que pacientes com alelo 2G apresentaram um risco três vezes maior de falha na osseointegração (SANTOS et al., 2004). Esse mesmo SNP está relacionado à periodontite (LI et al., 2012; ASTOLFI et al., 2006), ao câncer bucal (LI et al., 2018); ao desenvolvimento de lesões periapicais por necrose pulpar (TROMBONE et al., 2016) e à suscetibilidade a osteoartrite da articulação temporomandibular (LUO et al., 2015).

Na região promotora do gene da collagenase-2, o SNP MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395) demonstrou ser um fator de risco na perda precoce de implante (COSTA-JUNIOR et al.), à perimplantite e à inflamação na região periimplantar (THIERBACH et al., 2016). Arakawa e colaboradores (2012) indicam a MMP-8 como possível marcador de perda óssea progressiva na periimplantite. Tão importante como as collagenases anteriores, o gene da collagenase-3 apresenta o SNP MMP-13

g.-77 A>G (rs2252070) que está associado com risco da forma altamente agressiva de câncer bucal e lesões periapicais (VAIRAKTARIS et al., 2007).

Entre as estromelisinases, o gene da MMP-3 apresenta o SNP MMP-3 g. -1612 5A>6A (rs3025058) que foi associado à periodontite inicial (HEIKKINEN et al., 2016), à formação de lesão periapical em indivíduos com lesões por cáries profundas não tratadas (MENEZES-SILVA et al., 2012) e ao aumento do risco de câncer bucal (NOSRATZEHI et al., 2017).

A MMP-2 e a MMP-9 (gelatinase A e B) são produzidas por células endoteliais, fibroblastos, células inflamatórias e células ósseas e interferem no metabolismo ósseo local, além de estarem envolvidas na remodelação dos tecidos conjuntivos.

O SNP MMP-2 g.-1306 C> T (rs243865) modifica a atividade promotora do gene MMP-2, alterando o sítio do promotor tipo Sp1 e diminuindo significativamente a atividade transcricional (o alelo T tem uma atividade 50% menor do que o alelo C) (16). No SNP MMP-9 g.-1562C> T (rs3918242), foi relatado que o alelo T aumenta a atividade do promotor em quase 2 vezes.

Além disso, os SNPs MMP-2 e MMP-9, bem como os haplótipos, foram frequentemente adaptados como biomarcadores de doenças para o tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Luizon, Almeida Belo, 2012). Estes SNPs tem sido associado ao aborto espontâneo (Li et al., 2018), síndromes hepatopulmonares (Liu & Chen, 2018), câncer oral (Tsai et al., 2018), neurite óptica (Liutkeviciene et al., 2018), lesões periapicais (MENEZES-SILVA et al., 2012). O polimorfismo na MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) também foi relacionado à periodontite crônica e parece ter um efeito protetivo nessa doença (AJMERA et al., 2016).

A atividade da MMP-14 pode ser potencializada pela capacidade de ativação de outras MMPs e pela formação de complexos que participam da degradação de fibras colagenosas na região pericelular. Dessa forma, podem desestabilizar a degradação da matriz extracelular na região periimplantar (KASURINEN et al., 2018). Uma pesquisa datada de 2012, mostrou que polimorfismos no gene da MMP-14, pode contribuir para a predição de suscetibilidade e desenvolvimento patológico do câncer bucal (WENG et al., 2012). Apesar de existirem poucos estudos relacionando a MMP-14 com doenças orais, o conhecimento acerca dessa enzima

parece promissor, pela associação que estabelece com as demais moléculas em processos fisiológicos e patológicos.

Alguns SNPs em citocinas e genes de mediadores lipídicos foram associados à perda de implantes, periimplantitis e outras doenças bucais, explicando alguns dos fatores de risco interindividuais (SANTOS et al., 2004; LEITE et al., 2008; COSTA-JUNIOR et al., 2013; PIGOSSI et al., 2014; CASADO et al., 2015; COSYN et al., 2016, PETKOVIC-CURCIN et al., 2017, SAMPAIO et al., 2017).

É importante salientar que os SNPs podem ter seus efeitos mascarados por polimorfismos em diferentes regiões do mesmo gene, ou em outros genes que participam da complexa rede de mediadores inflamatórios da região periodontal. Portanto, a análise em haplótipo ou em combinação parece ser importante para entender o real papel dos SNPs no processo de osseointegração.

Um haplótipo é uma combinação em alelos de loci sintênicos, que são transmitidos juntos. Muitas vezes não se detecta a influência de um único sítio polimórfico na patologia, entretanto, quando analisado o haplótipo de diferentes polimorfismos, alelos herdados em sintênia podem influenciar significativamente a predisposição e/ou evolução de determinada patologia.

O haplótipo dos SNPs MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750) e MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393) foi associado à perda precoce de implantes dentais (LEITE et al., 2008), entretanto, a literatura não demonstra outros estudos relacionando a influência de haplótipos no processo de osseointegração.

As MMPs são importantes durante a remodelação óssea, portanto, a análise de SNPs em genes de MMPs parece importante para a compreensão da influência genética das MMPs na perda precoce de implantes dentais.



### 3. OBJETIVO GERAL

Analisar a influência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes das metaloproteinases (MMPs), isoladamente e em haplótipo na osseointegração de implantes dentais em estudo de associação caso-controle.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a influência do SNP MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) e o risco de perda precoce do implante dental.
2. Investigar a influência dos SNPs MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), e MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) em combinação haplotípica e o risco de perda precoce do implante dental.
3. Investigar a influência do SNP MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070) e o risco de perda precoce do implante dental.
4. Investigar a influência dos SNPs MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) e MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) e o risco de perda precoce do implante dental.
5. Investigar a influência do SNP MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) e o risco de perda precoce do implante dental.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo transversal de caso-controle, que seguiu as diretrizes da Declaração de Helsinque. Os voluntários deste estudo caso-controle concordaram em participar livremente e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa: CEP / SD-B CAAE: 54921616.0.0000.0102, parecer consubstanciado nº1618232 de 01/07/2016 (ANEXO I).

Os pacientes foram recrutados em três clínicas dentárias do Sul e Sudeste do Brasil, sendo Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba - São Paulo; Instituto Latino-Americano de Pesquisa Odontológica, Curitiba - Paraná e Instituto de Pós-Graduação e Pesquisa em Odontologia, Balneário Camboriú - Santa Catarina. A taxa de perda do implante (precoce e tardia) desses centros foi menor que 3%.

Todos os voluntários são não fumantes, maiores que 18 anos e estavam em boa saúde geral e bucal. Foram excluídos pacientes com diabetes, osteoporose, infecção por HIV, hepatite, quimioterapia imunossupressora ou comprometimento grave da função imunológica. Também foram excluíram pacientes que submeteram a carga precoce, cirurgia regenerativa, como enxerto ósseo, ou tiveram complicações pós-cirúrgicas, como infecção.

Os indivíduos foram divididos em dois grupos: grupo teste voluntários que sofreram uma ou mais perda precoces nos implantes dentais, concordaram em participar do estudo e não possuíam nenhum dos critérios de exclusão; grupo controle voluntários sem perda de implantes e que apresentaram o mínimo de um ano de função; pareados por idade, sexo, número de implantes e posição; selecionados das mesmas clínicas odontológicas.

O implante sadio foi considerado avaliando a imobilidade do implante, a saúde dos tecidos peri-implantes (incluindo a extensão da perda óssea, profundidade da bolsa e sangramento à sondagem), função e conforto do paciente. Os critérios diagnósticos utilizados para a avaliação das falhas dos implantes foram presença de mobilidade e/ou dor, antes ou durante a conexão do *abutment* com necessidade de removê-lo.

As três clínicas utilizaram 90% de implantes Neodent® e 10% de outras marcas, de acordo com indicação clínica e custo.



Estes critérios rigorosos na obtenção das amostras objetivam reduzir a influência de fatores sistêmicos na perda do implante, para analisar a influência dos SNPs.

#### 4.1 OBTENÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA dos pacientes foi obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal, por meio de um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos (Trevilatto, 2000; Line, 2000). Nesta solução, foram adicionados 1ml de solução TNE (10MM Tris pH 8, 150MM NaCl e 2mM EDTA) e 1ml de Etanol e o material foi congelado a -20°C até o momento da extração do DNA. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois, constitui o método pouco invasivo, prático e eficiente para obtenção do DNA.

A extração do DNA foi realizada conforme protocolo de Aidar e Line (2007). As amostras foram incubadas por 16 horas com 20ng/ml de proteinase K (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a 56°C. Foram adicionados 500µl de solução de acetato de amônio 10mM com EDTA 1mM e vortexado por 5 segundos. Após centrifugação a 17000g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e foram adicionados 540µl de isopropanol para cada 900µl da solução contendo DNA. Após centrifugação, o sobrenadante foi submetido à lavagem com etanol a 70% e seco por 15 minutos a 37°C. Foi realizada suspensão do DNA em 100µl de tampão TE (Tris-Cl 10 mM (pH 7,8) e EDTA 1 mM) a temperatura ambiente por três horas. A concentração do DNA genômico de cada amostra foi quantificada com o auxílio de um quantificador de DNA Nanodrop e sua pureza estimada pela razão OD 260/280.

#### 4.2 GENOTIPAGEM

Para genotipagem foram utilizadas as técnicas de PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) cujos parâmetros estão descritos na TABELA 1.

A reação de PCR foi realizada em termociclador convencional (Eppendorf, Mastercycler Gradient) e teve volume final de 15µl contendo aproximadamente 200ng de DNA, oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada fragmento e 10µl

de Go Taq Green *Master Mix*® (Promega®). A mistura com todos os reagentes foi submetida a uma desnaturação inicial a 95° por 3 minutos. Em seguida, utilizados trinta e cinco ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, por fim, uma extensão final de 10 minutos à 72°C.

Os fragmentos dos genes amplificados foram submetidos à RFLP para gerar fragmentos menores. A reação teve volume final de 20µl, sendo 10µl produto de PCR, enzimas específicas e água ultrapura, sendo a mistura encubada por 16 horas em estufa a 37°C, exceto o SNP MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), que utilizou a temperatura de 65°C.

TABELA 1- CONDIÇÕES GERAIS PARA REALIZAÇÃO DE PCR E RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS GENES DA MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307).

SNP	Oligonucleotídeos Iniciadores (5' – 3')	*PCR RFLP	Pares de base PCR- RFLP
MMP-1 (rs1144393)	F: CATGGTGCTATCGCAATAGGGT R: TGCTACAGGTTTCTCCACACAC	45°C 60s <i>KpnI</i>	200 (alelo G) 176 + 24 (alelo A)
MMP-1 (rs1799750)	F: TCGTGAGAATGTCTTCCATT R: TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTGAAATC	55°C 30s <i>XmnI</i>	118 (alelo 2G) 89 + 29 (alelo G)
MMP-8 (rs11225395)	F: CAGAGACTCAAGTGGA R: TTTCATTTGTGGAGGGGC	52°C 30s <i>Sfcl</i>	106 (alelo C) 74 + 32 (alelo T)
MMP-13 (rs2252070)	F: GATACGTTCTTACAGAAGGC R: GACAAATCATCTTCATCACC	50° 60s <i>BsrI</i>	445 (alelo A) 197 + 248 (alelo G)
MMP-3 (rs3025058)	F: GGTTCTCCATTCTTTGATGGGGGGAAAGA R: CTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT	53°C 60s <i>Tth111I</i>	129 (alelo 6A) 97 + 32 (alelo 5A)
MMP-2 (rs243865)	F: CTTCTAGGCTGGTCCTTACT R: CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAG	62° 60s <i>FspBI</i>	188+5 (alelo C) 162+26+5 (alelo T)
MMP-9 (rs3918242)	F: GCCTGGCACATAGTAGGCC R: CTCCTAGCCAGCCGGCATC	65°C 30s <i>PaeI</i>	435 (alelo T) 247 + 188 (alelo C)
MMP-14 (rs2236307)	F:GTAGTCTACACCCACGCCTG R:GACAAACATCTCCCCTCGGA	64°C 60s <i>HphII</i>	442 (alelo C) 302+140 (alelo T)

F: oligonucleotídeos iniciadores foward; R: oligonucleotídeos iniciadores reverse; \* PCR: temperatura e tempo de anelamento; RFLP: enzima de restrição.

#### 4.3 ELETROFORESE

As sequências amplificadas (PCR) e digeridas (RFLP) foram analisadas por eletroforese em géis horizontais de agarose 2% ou géis verticais de poliacrilamida 8%, conforme tamanho dos fragmentos e corados com corante não mutagênico Gel Red® protocolo econômico (Biotium®). Os padrões de bandas dos géis foram visualizados em transluminador e a imagem capturada por fotodocumentador utilizando software *Digi Doc*.

#### 4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para analisar as frequências dos alelos e dos genótipos entre os grupos caso e controle foi utilizado o teste qui-quadrado nível de significância 5% ( $p < 0.05$ ), pelo programa BioEstat versão 5.0.

As análises de regressão logística múltipla e desequilíbrio de ligação foram realizadas utilizando o software R (R Development Core Team, 2015). As análises de estimativa de haplótipos, desequilíbrio de ligação e equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo software phase (<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>).

O Teste U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar diferença entre a idade dos pacientes, posição e número de implantes.

## 5. CAPÍTULO I - ARTIGO PUBLICADO

Título: ***Analysis of MMP-3 polymorphism in osseointegrated implant failure.***

Data da publicação: julho/setembro 2017- Volume 15, número 4.

Periódico: *Brazilian Journal of Oral Sciences*

ISSN: 1677-3225

Qualis Capes – Área de avaliação: Ciências Biológicas II

Classificação: B5

Qualis Capes – Área de interesse: Odontologia

Classificação: B3



# Analysis of MMP-3 polymorphism in osseointegrated implant failure

Francielle Boçon de Araujo Munhoz<sup>1</sup>, Paula Regina Bach Nogara<sup>2</sup>, Francisco Rafael da Costa Junior<sup>3</sup>, Filipe Polese Branco<sup>4</sup>, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos<sup>5</sup>

<sup>1,2,3</sup>PhD student Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

<sup>4</sup>PhD Professor Faculty Avantis of Balneário Camboriú, Balneário de Camboriú, SC, Brazil

<sup>5</sup>PhD Professor Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

## Abstract

Polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) genes have been associated with several pathologies, including dental implant loss. MMP-3 is crucial to the connective tissue remodeling process. The objective of this study was to investigate the possible relationship between -1612 MMP-3 polymorphism and the early implant failure. A sample of 240 non-smokers was divided: test group 120 patients with one or more early failed implants and control group 120 patients with one or more healthy implants. Genomic DNA from oral mucosa was analyzed by PCR-RFLP. No association of early implant loss with genotypes and alleles of the -1612 polymorphism in MMP-3 were found by the Chi-squared test. Only the presence of the -1612 polymorphism of MMP-3 is not a genetic risk factor for early loss of implants.

**Keywords:** Polymorphism. Metalloproteinase. Implant loss. Risk factor.

## Introduction

Dental implants have become important therapeutic option and are now the most chosen option for oral rehabilitation in edentulous and partially dentate patients because of its high predictability and success rate.

However, the literature reported global failure rates of 1.9-3.6%<sup>1</sup>, despite adequate surgical and medical treatment. Several risk factors, like osteolysis, medical pre-conditions, poor bone quality, smoking, one-or-two-step surgery, have been proposed in literature<sup>2</sup>. In addition studies have demonstrated that implant material is an important determinant of treatment outcome<sup>3</sup>. The fact that only in a minority of titanium particles induce inflammation and osseointegration, suggests an important role of host factors, in particular the immune response to titanium.

In addition this, multiple implant failures in the same patient, the cluster phenomenon, indicate that individual's host response play a significant role in the implant loss<sup>4</sup>. Gene polymorphisms are a biologically normal condition which individuals may exhibit genetic variations, which may increase their susceptibility to a certain disease. Polymorphisms in matrix metalloproteinases (MMPs) genes have been associated with a number of pathologies, including dental implant loss<sup>5-7</sup>.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are the major class of enzymes capable of cleaving all extracellular matrix substrates, including collagens, fibronectin, laminin, vitronectin and proteoglycans<sup>8</sup>, and are involved in physiological and pathological

Received for publication: XXXX

Accepted: XXXX

Correspondence to:

Francielle Boçon de Araujo Munhoz  
Av. Cel Francisco H dos Santos, s/n, Jardim das  
Américas, 81531-990, Curitiba - PR, Brazil.  
Phone: +55-041-33611598  
Fax: + 55-041-3266-2042  
E-mail: francielle.bocon@hotmail.com

processes. MMPs regulate a variety of cell behaviors such as cell proliferation and motility, apoptosis, angiogenesis, effects on the immune system and host defense, and modulation of the bioactivity of chemokines<sup>8</sup>. In fact, MMPs are expressed by the major inflammatory and connective tissue cells in response to specific stimuli of remodeling, including implant osseointegration. Besides, the literature demonstrated that MMP levels in peri-implant sulcular fluid are high, including MMP-13<sup>9</sup>.

MMP-3, or stromelysin-1, have broad substrate specificity and have an important role in remodeling of connective tissue. It participated of turnover of diverse extracellular matrix components, including non-fibrillar collagens, laminin, proteoglycan and fibronectin. It also activates other MMPs, such as MMP-1, MMP-2 and MMP-9; as well as its own proenzyme<sup>10,11</sup>. MMP-3 can be produced by fibroblasts, macrophages, neutrophils, chondrocytes, synovial cells, and smooth muscle cells and can be induced in reaction to local stimulation such as mechanical loading<sup>12</sup> and inflammation<sup>13</sup>.

The MMP-3 gene, located on chromosome 11, has functional polymorphisms in the promoter region -1612 characterized by containing either five or six consecutive adenines (5A/6A) and has been associated with various pathologies including periodontal disease<sup>14</sup>.

In present study the purpose was to investigate the relationship between -1612 polymorphism in the MMP-3 gene and early failure of osseointegrated oral implants.

## Material and Methods

### Study population

A sample of 240 non-smoking subjects, > 18 years of age, were recruited for study from the patient pool at the Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba – University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, São Paulo, Brazil, Latin American Institute for Dental Research, Curitiba, Paraná, Brazil and private implantology clinical in São Paulo, Bahia, Paraná - Brazil. The rate of implant loss of these centers was less than 3%. All patients were advised previously about the nature of the study and signed a consent form within a protocol approved by an Institutional Review Board (Ethical Committee in Research at FOP-UNICAMP, protocol 006/2002). This study has followed the guidelines of Helsinki Declaration.

All subjects were in good general and oral health and did not have any of the following exclusion criteria: a history of diabetes or osteoporosis, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, history of any disease known to severely compromise immune function. It also excluded patients that submitted a precocious prosthesis load or regenerative surgery, such bone grafting, and have had postsurgical complications, such as infection. All patients have a transgingival healing concept performed..

The groups were matched by gender and age; with 66% female and mean age 49 (range 18-80). The groups were matched by implant position; with 61% mandibular region and 67% posterior region. Subjects were divided into two groups: control group, 120 patients with one or more healthy implants

for a minimal period of 1 year, and test group, 120 patients that had suffered one or more early implant failures, considered when presented mobility and/or pain before or during the abutment connection and needed to be removed.

### Genotyping

DNA from epithelial buccal cells was extracted using the procedure described by Aidar and Line<sup>15</sup>. DNA concentration (ng/ $\mu$ L) was estimated by measurements of optical density 260/280 nm ratio greater than 1.9.

The MMP-3 genotype was determined by the PCR-RFLP assay. The PCR primers used for amplifying the MMP-3 polymorphism were: forward primer 5'-GGTCTCCATTCCCTTTGATGGGGGAAAgA-3' and reverse primer 5'-CTTCCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT-3'. The forward primer for amplifying the MMP-3 fragment was mutated from A to G at the second nucleotide close to the 3' end to create a *Tth1111* recognition site in the case of a 5A allele. PCR were carried out in a total volume of 10  $\mu$ L, containing 400ng genomic DNA, 5  $\mu$ L of *Taq Green Jumpstar Taq ReadyMix* (Amersham Pharmacia-Biotech, Uppsala, Sweden) and 200 nmol of each primer. A 6  $\mu$ L aliquot of PCR products were then digested with 1 unit of *Tth1111* enzyme at 37°C overnight. The total amount aliquot of the digest was electrophoresed on a 10% vertical non-denaturing polyacrylamide gel at 20 mA. The gel was stained by ethidium bromide.

### Statistical analysis

Mann-Whitney U test was used to determine any significant differences between ages and gender. The significance of the differences in the observed frequencies of polymorphism between both groups was assessed using the Chi-squared test with  $p < 0.05$  indicating statistical significance. The program ARLEQUIN (v. 2.0 — Schneider et al., 2000)<sup>16</sup> was used to verify the Hardy-Weinberg equilibrium in the studied sample. To verify statistical power of our sample, we used G\*POWER software.

## Results

The primers used were efficient to amplify the fragment and the *Tth1111* enzyme digestion cleaves the PCR products in two fragments when the polymorphism site contained the 5A allele. Electrophoresis produced DNA bands of 97 and 32 bp for 5A alleles and a band of 129 bp for 6A alleles, whereas the heterozygote displayed a combination of both alleles (129, 97 and 32 bp).

Genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical power estimation for our sample showed 99% for association detection.

The statistical analysis did not show significant differences in the alleles and genotypes ( $p=0.2$ ) of the -1612 5A/6A in MMP-3 between the two sample groups. The result shows that in both groups was the higher frequency of allele 6A and the 5A/6A genotype (Table I).



**Table 1** - Distribution of the MMP-3 allele and genotype in the control and test group.

MMP-3 (-1612)	Control Group		Test Group		Chi- Squared	OR (95% IC)
	n	%	n	%		
Allele	n = 240		n = 240		p = 0,24	0.80 (0.56-1.12)
5A	102	42.5	115	48.0		
6A	138	57.5	125	52.0		
Genotype	n = 120		n = 120		p = 0,23	0.89 (0.47-1.70)
5A/5A	22	18.3	24	20.0		
5A/6A	58	48.3	67	55.8		
6A/6A	40	33.3	29	24.2		

## Discussion

Biological, microbiological and biomechanical factors can be accredited implant loss, however the exact cause and mechanism of early implant failure are still uncertain. An abnormal immune-inflammatory response, involving fibroblasts, keratinocytes, macrophages, neutrophils, lymphocytes, endothelial cells, osteoclasts and osteoblasts, can destroy the peri-implant and periodontal tissues<sup>17</sup>. Moreover, an intense inflammatory process is mediated by cytokines which point to different cell types and stimulating the production of prostaglandins and matrix metalloproteinases, which are associated with bone and connective tissue breakdown<sup>18</sup>. The cluster phenomenon supports the evidence that individual characteristics play an important role in transcription of these inflammatory mediators and may influence the osseointegration success. Some studies show the influence of genetic polymorphisms in inflammatory mediators in implant loss. Cosyn et al.<sup>19</sup> (2016) demonstrated that the IL-1B (+3954) gene polymorphism affect osseointegration, beside previous studies not found evidence<sup>20</sup>. The genotype 2/2 of IL1RN polymorphism and the C allele of IL-4 polymorphism was associated with susceptibility to dental implant loss<sup>20,21</sup>. In non-smokers, have been show that a polymorphism in the promoter region of MMP-1 and MMP-8 gene is strongly associated with the early implant loss<sup>5-7</sup>. Our group suggested that haplotype G-1607GG and A-519G of MMP-1 may be associated with the osseointegration process<sup>6</sup>.

However, many others studies found no significant association between dental implant loss and polymorphism in inflammatory mediators such as MMP-9, IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-A, TGF-B, VNTR, and others<sup>2,20-23</sup>. In this study, the -1612 5A/6A polymorphism in the promoter region of MMP-3 gene was also not associated with early implant failure in non-smokers.

In meta-analysis studies<sup>24,25</sup> point that is important methodological and study design restricted to validate the associations, even though it has been raised as one of the potential risk indicators.

Early implant failure in non-smokers have a reduced frequency. Nevertheless, smoking is a strong risk factor for early implant failure - smokers have a 3% greater chance of losing an implant compared to non-smokers<sup>26</sup>, so studies that includes smokers would possibly mask the genetic influence.

In this study, we observed a number of patients in the test group with reliable estimated statistical power, despite put out smokers. Others risk factors with age, status periodontal, and medically compromised were exclude or matched.

In osseointegration, as with any complex process seems to be a combination of several polymorphisms act synergistically significant risk that increases the susceptibility to failure. So, it is important to consider that this MMP-3 polymorphism may have their effects masked by polymorphisms in different regions of a gene or other genes involved with periodontal inflammatory mediators. However, to identify the influence of each allele, it is essential to analyze the relative contribution of each polymorphism.

Since MMP-3 activates the MMP-1 and polymorphism in MMP-1 was associated with implant loss, it seems important to assess the linkage disequilibrium between the polymorphisms of MMP-3 and MMP-1 which are located on chromosome 11q22.3 adjacent to each other. It seems to be of great value to understand osseointegration process and the mechanisms of functional compensation of the individual. In future studies of the investigation of polymorphisms in the MMP-3 gene, mainly in haplotype combination, remains to be considered regarding implant loss due to the importance of this gene in osseointegration.

To understand the complex osseointegration failure is important analyze haplotype frequencies and imbalances between various polymorphisms. It could be help in clinical investigation of individuals at high risk to implant loss and, in future, guide the development of individual therapeutics to increasing the implants success rates.

## Conclusion

In conclusion, no associations were found between -1612 5A/6A polymorphisms of the MMP-3 gene promoter and early implant failure, suggesting that the presence of this polymorphism alone are not a genetic risk factor for predisposition to early implant loss. Therefore, the investigation of polymorphisms in the MMP-3 gene, mainly in haplotype combination, remains to be considered regarding implant loss due to the importance of this gene in osseointegration.

## Acknowledgement

The authors wish to thank Professor Dr. Silvio Sanches Veiga for his assistances. This study was supported by the Fundação Araucária and CAPES

## References

1. Holm-Pedersen P, Lang NP, Muller F. What are the longevities of teeth and oral implants? Clin Oral Implants Res. 2007 Jun;18 Suppl 3:15-9.
2. Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Reasons for failures of oral implants. J Oral Rehabil. 2014 Jun;41(6):443-76. doi: 10.1111/joor.12157.
3. Porter JA, Von Fraunhofer JÁ. Success or failure of dental implants? A



- literature review with treatment considerations. *Gen Dent*. 2005 Nov-Dec;53(6):423-32; quiz 433, 446.
4. Weyant RJ, Burt BA. An assessment of survival rates and within-patient clustering of failures for endosseous oral implants. *J Dental Res*. 1993 Jan;72(1):2-8.
  5. Santos MC, Campos M, Souza AP, Trevilatto PC, Line SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Jan-Feb;19(1):38-43.
  6. Leite MFF, Santos MCLG, Souza AP, Line SRP. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jul-Aug;23(4):653-8.
  7. Costa-Junior FR, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC, de Souza AP, Santos MC. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):311-6. doi: 10.1007/s00784-012-0699-z.
  8. Cauwe B, Van den Steen PE, Opendakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007 May-Jun;42(3):113-85.
  9. Ramseier CA, Eick S, Brönnimann C, Buser D, Brägger U, Salvi GE. Host-derived biomarkers at teeth and implants in partially edentulous patients. A 10-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Feb;27(2):211-7. doi: 10.1111/clr.12566.
  10. Johnson JL, Dwivedi A, Somerville M, George SJ, Newby AC. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Sep;31(9):e35-44. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.225623.
  11. Woessner J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J*. 1991 May;5(8):2145-54.
  12. Leong DJ, Gu XI, Li Y, Lee JY, Laudier DM, Majeska RJ, et al. Matrix metalloproteinase-3 in articular cartilage is up-regulated by joint immobilization and suppressed by passive joint motion. *Matrix Biol*. 2010 Jun;29(5):420-6. doi: 10.1016/j.matbio.2010.02.004.
  13. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thøgersen IB, Enghild JJ, et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1996 Jun 21;271(25):14657-60.
  14. Astolfi CM, Shinohara AL, Da Silva RA, Santos MC, Line SR, De Souza AP. Genetic polymorphisms in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population. *J Clin Periodontol*. 2006 Oct;33(10):699-703.
  15. Aida M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52.
  16. Schneider S, D Roessli, L Excoffier. Arlequin v.2.000: software for population genetics data analysis. User manual: ver. 2.000. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.
  17. Seymour GJ, Gemmell E, Lenz LJ, Henry P, Bower R, Yamazaki K. Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989 Fall;4(3):191-8.
  18. Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. *J Am Dent Assoc*. 2002 Apr;133(4):452-9; quiz 492-3.
  19. Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, Coucke PJ, De Coster P, De Paepe A, et al. An Exploratory Case-Control Study on the Impact of IL-1 Gene Polymorphisms on Early Implant Failure. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016 Apr;18(2):234-40. doi: 10.1111/cid.12237.
  20. Montes CC, Alvim-Pereira F, De Castilhos BB, Sakurai ML, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Feb;20(2):208-17. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01629.x.
  21. Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant Dent*. 2014 Dec;23(6):723-31. doi: 10.1097/ID.0000000000000157.
  22. Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent*. 2005 Dec;14(4):391-6.
  23. Gurol C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011 Sep-Oct;26(5):955-60.
  24. Liao J, Li C, Wang Y, Ten M, Sun X, Tian A, et al. Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Mol Biol Rep*. 2014 May;41(5):2789-98. doi: 10.1007/s11033-014-3133-6.
  25. Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. *Clin Oral Implants Res*. 2012 Jul;23(7):775-88. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02329.x.
  26. Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):527-51.

## 6. CAPÍTULO II - ARTIGO PUBLICADO

Título: ***Matrix Metalloproteinases gene polymorphism haplotype is a risk factor to implant loss: A case-control study.***

Data da publicação: agosto, 2018.

Periódico: *Clinical Implant Dentistry and Related Research*

ISSN: 1523-0899

Fator de impacto: 3.097

Qualis Capes – Área de avaliação: Ciências Biológicas II

Classificação: A2

Qualis Capes – Área de interesse: Odontologia

Classificação: A1

## ORIGINAL ARTICLE

# Matrix metalloproteinases gene polymorphism haplotype is a risk factor to implant loss: A case-control study

Francielle Boçon de Araujo Munhoz PhD<sup>1</sup> | Filipe Polese Branco PhD<sup>2</sup> |

Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza PhD<sup>3</sup> | Maria Cristina Leme Godoy dos Santos PhD<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>2</sup>Institute of Postgraduate and Research in Dentistry (IPPO), Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brazil

<sup>3</sup>Department of Genetics, University Federal of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil

## Correspondence

Maria Cristina Leme Godoy Santos, University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Rua Francisco H. dos Santos, Jd. das Américas, 81531-990, Curitiba Paraná, Brazil.  
Email: lemegsantos@gmail.com

## Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 40001016007P8; CNPq, Grant/Award Number: 40001016007P8

## Abstract

**Background:** Dental implants consist in the treatment of choice to replace tooth loss. The knowledge that implant loss tends to cluster in subsets of individuals may indicate that host response is influenced by genetic factors. Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that contribute to degradation and removal of collagen from extracellular matrix.

**Purpose:** This case-control study aimed to investigate the haplotypic combination of MMP polymorphism (rs1144393, rs1799750, rs3025058, and rs11225395) and implant loss.

**Materials and Methods:** Two hundred nonsmokers subjects were matched by gender, age, implant number and position and divided in control group, 100 patients with one or more healthy implants, and test group, and 100 patients with one or more implant failures. Genomic DNA was extracted from saliva and genotypes were obtained by PCR-RFLP.

**Results:** A significant association of rs1799750 (MMP-1) and rs11225395 (MMP-8) polymorphism on early implant loss was demonstrated ( $P \leq 0.001$ ). Global haplotype analysis indicated a significant difference between both groups ( $P < 0.0001$ ). Haplotype T-A-GG-5A-C had a statistically significant risk effect, while haplotype C-A-G-6A-C and T-G-2G-5A-C had a protective effect in implant loss.

**Conclusions:** The results of this study showed that MMPs haplotype are a risk factor to early implant loss.

## KEYWORDS

case-control study, implant loss, implant survival, metalloproteinase, polymorphism, risk factor

## 1 | INTRODUCTION

The etiology of implant loss is a multifactorial process, and various extrinsic and intrinsic factors have been proposed to explain it. However, in some case, the cause and mechanism of implant failure are still obscure. Primary or mechanical stability in the oral implant is considered a key factor for successful osseointegration. Immediately and up to several months after surgery, a series of cellular and molecular events occur where the host's tissues biologically integrate the implant into the native bone structure.<sup>1</sup>

The osseointegration is a complex and dynamic process that occur via contact osteogenesis, the implant surface is populated by bone cells to form the new bone and via distance osteogenesis, bone formation is preceded by the resorption—osteoclastogenesis of the

existing tissue. Recent studies suggested that contact osteogenesis is dependent on triggering factors produced during distance osteogenesis.<sup>2</sup> So, bone cell synthesize and release diverse cytokines and lipid mediators, including matrix metalloproteinases (MMPs), which mediate the osteogenesis and inflammatory processes on implant osseointegration.

In one of the early stages of osseointegration process, bone lining cells have been shown to digest the collagen fibers mediated by MMPs and clean the bone surface to facilitate remodeling.<sup>1</sup> Osteoclast, osteoblast, and osteocyte also release MMPs during their activity. In fact, MMPs are the major class of enzymes capable of cleaving all extracellular matrix substrates and also regulate key cell behavior and signaling pathways toward remodeling of tissue,<sup>3</sup> including in implant osseointegration.



Previous studies have also shown that MMPs are present in peri-implant sulcular fluid and levels and molecular forms of MMPs can play a pathologic role in bone loss.<sup>4-7</sup>

Some single-nucleotide polymorphism (SNPs) may affect gene expression levels and protein production or functions; consequently, they influence osteogenesis and inflammatory responses. Some SNPs in cytokines and lipid mediators genes were associated with implant loss and peri-implantitis, explain some of interindividual risk factors.<sup>8-29</sup>

However, many studies evaluate the haplotype and implant loss. Haplotype is to mean a set of SNPs that tend to always occur together and that are associated statistically. Haplotypes show a higher probability of exerting such effects than individual SNPs because of linkage disequilibrium with an unknown causal variant, especially the rare ones. It is also possible that synergistic action of different SNPs increases the risk of implant loss. All that considered, the analysis of MMPs haplotype frequencies seems to be of great value for understanding osseointegration failure.

Therefore, the purpose of this case-control study was to investigate the SNPs isolated and haplotypic combination of MMP SNPs- MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750), MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058), and MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) as a risk factor to osseointegrated early implant loss.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Subjects

This is a case-control cross-sectional study, which followed the guidelines of the Declaration of Helsinki. Ethical Committee in Research at CEP/SD-PB n° 54 921 616.0.0000.0102 approved the study protocol and written consent was obtained from each participant.

Two hundred nonsmokers volunteers from three regions of Brazil were recruited in pool of Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba - Piracicaba, São Paulo; Latin American Institute for Dental Research - Curitiba, Paraná and Institute of Postgraduate and Research in Dentistry - Balneário Camboriú, Santa Catarina. The rate of total implant loss (early and later) of these centers was <3%. Patients who had suffered early implant failures and accepted to participate in the study, whose records did not have any of the exclusion criteria, were included. The control group was composed of volunteers, matched by gender, age and implant number and position selected from the same Dental Clinics, presenting at least one implant in function for a minimal than 1 year and without any implant loss.

All subjects were in good general and oral health and did not have any of the following exclusion criteria: smokers, a history of diabetes or osteoporosis, hepatitis or HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, history of any disease known to severely compromise immune function. It also excluded patients who submitted a precocious prosthesis load or regenerative surgery, such bone grafting, and have had postsurgical complications, such as infection. All patients have a transgingival healing concept performed.

Subjects were divided into two groups: control group, 100 patients with one or more healthy implants for a minimal period of 1 year, and test group, 100 patients who had suffered one or more

early implant failures. Healthy implant was considered evaluating implant immobility, health of peri-implant tissues (including the extent of bone loss, pocket depth, and bleeding on probing), function and comfort of patient. Diagnostic criteria used for the assessment of implant failures presented mobility and/or pain before or during the abutment connection and needed to be removed. All patients with early implant failure in period of study, who accepted to participate and did not have any of the exclusion criteria, were selected.

### 2.2 | Genotyping

Buccal epithelial cells sample was collected in dental appointment after volunteers' selection. The individual undertook a mouthwash after 1 minute, contain 5 mL 3% glucose.<sup>14</sup> Buccal epithelial cells were pelleted by centrifugation at 2000 rpm for 10 minutes. The cell pellet was resuspended in 1.300 mL of extraction buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.8], 5 mM EDTA, 0.5% SDS) with 10 µL proteinase K (20 mg/mL) and being left overnight at 65°C. DNA was purified by ammonium acetate 10 M, precipitated with isopropanol, and resuspended with 100 µL Tris 10 mM (pH 7.6), the procedure described by Aidar and Line.<sup>17</sup> DNA concentration (ng/µL) was estimated by measurements of optical density 260/280 nm ratio greater than 1.9.

The SNPs had previously been identified and included in the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) with minor allele frequencies greater than 0.15. The MMPs genotypes were determined using the PCR-RFLP assays. The primer sequences, PCR conditions, and restriction enzymes are detailed in Table 1.

PCR were carried out in a total volume of 20 µL containing approximately 200 ng of genomic DNA, 200 nmol of specific primers and 1 unit of Go Taq Green PCR Master Mix (Promega Corporation - St. Madison). A 10 µL aliquot of PCR products was then digested with 1 unit of specific enzyme (restriction enzymes; Thermo Scientific- Fermentas Life Science - St. Lithuania, UE) overnight. The total amount of aliquot of the digest was electrophoresed on a 2% agarose gel at 20 mA and stained by GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, Inc. Fremont, California).

Part of the samples (30% of samples) was genotype in the previous studies of our research group.<sup>8-10,18</sup>

### 2.3 | Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was used to determine any significant differences between ages, gender and implant number, and position of both groups. Both groups showed similar means of age, as follows: 49 years (18-76) for the control group and 49.2 years (20-80) for the test group (*P* = 0.08). Each group has 65% female and 61% maxillary implant, and mean of 4.6 implants by volunteers.

Chi-square test was applied to compare alleles and genotypes frequencies between patients and controls. Statistical analysis of the haplotype estimation, linkage disequilibrium, and Hardy-Weinberg equilibrium was conducted using PHASE software (<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>). The linkage disequilibrium and the multiple logistic regressions analyses using codominant, dominant, and recessive model were conducted with R.<sup>19</sup> Conditional haplotype-



**TABLE 1** PCR-RFLP Conditions for MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 a > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058) Polymorphism

SNP	Primers (5' to 3')	Annealing	RFLP	Pb PCR- RFLP
MMP-8 (rs11225395)	F <sup>a</sup> : CAGAGACTCAAGTGGGA R <sup>b</sup> : TTT CATTGTGGAGGGGC	52°C 30s	Sfcl 37°	106 (allele C) 74 + 32 (allele T)
MMP-1 (rs1144393)	F <sup>a</sup> : CATGGTGCTATCGCAATAGGGT R <sup>b</sup> : TGCTACAGGTTTCTCCACAC	45°C 60s	KpnI 37°	200 (allele G) 176 + 24 (allele A)
MMP-1 (rs1799750)	F <sup>a</sup> : TCGTGAGAATGTCTCCATT R <sup>b</sup> : TCTTGGATTGATTGAGATAAGTGAAATC	55°C 30s	XmnI/Pdml 37°	118 (allele 2G) 89 + 29 (allele G)
MMP-3 (rs3025058)	F <sup>a</sup> : GGTTCTCCATTCTTTGATGGGGGAAAGA R <sup>b</sup> : CTTCTGGAATTCACATCACTGCCACCACT	53°C 60s	Tth111I 37°	129 (allele 6A) 97 + 32 (allele 5A)

<sup>a</sup> Primer forward.<sup>b</sup> Primer reverse.

based association test was applied (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/whap.shtml>).

### 3 | RESULTS

All genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium. In this study, MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) SNPs were confirmed in the roll of MMPs associated with implant loss (Table 2). Considering the MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) SNP, there were significant differences in the frequencies of alleles and genotypes between control and test groups. The 2G allele was found in 38% of the test group and 21.5% of the control group ( $P = 0.0005$ ; OR 95% 2.24 [1.44-3.48]). In the test group, the 1G/2G genotype was observed with a frequency of 58%, while in the control group, 63% were heterozygosis ( $P = 0.0001$ ; OR 95% 3.46 [1.93-6.19]). In MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) SNP, the C allele was found in 24.5% and 40% of test and control groups, respectively ( $P = 0.001$ ; OR 95% 0.49 [0.32-0.75]); and the genotype was more frequent as T/T in test group (63%) and T/C in control group (48%) ( $P = 0.0005$ ; OR 95% 0.33 [0.19-0.59]).

Considering the MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393) and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058), the statistical analysis did not show any significant differences in the alleles and genotypes between the two sample groups (Table 2).

SNPs used for inference of haplotype were sorted according to their disposition on chromosome 11q22.2 (MMP-8, MMP-1) and 11q22.3 (MMP-3). Both groups had 13 haplotypes in common, the case group had three and control group had one exclusive haplotypes. Haplotype distribution analysis indicated a significant difference between both groups ( $P < 0.0001$ ) (Table 3). In haplotype analysis, T-A-GG-5A haplotype had a statistically significant risk effect in implant loss, whereas C-A-G-6A, C-G-G-6A haplotypes had a statistically significant protective effect in implant loss.

Conditional haplotype-based association test showed that overall variation at this locus appears to influence the trait, with significant  $P$  value.

We found no linkage disequilibrium between MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750), and low linkage disequilibrium among the others (Table 4).

The results of multiple logistic regressions codominant and recessive model suggest that the genotypes MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) ( $P = 7.07 \times 10^{-9}$ ), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) ( $P = 1.49 \times 10^{-5}$ ) are independent variables in risk implant failure. The presence of allele 2G in MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) ( $P = 2.46 \times 10^{-6}$ ) is risk factor and the allele C in MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) ( $P = 6.41 \times 10^{-8}$ ) are independent protective factor to osseointegration (Table 5).

### 4 | DISCUSSION

Biological, microbiological, and biomechanical factors can be accredited for implant loss; however the exact cause and mechanism of early implant failure are still uncertain. An abnormal immune-inflammatory response, involving diverse cell-like fibroblasts, macrophages, neutrophils, lymphocytes, endothelial cells, and bone cells can destroy the peri-implant and periodontal tissues.<sup>20</sup> Moreover, an intense inflammatory process is mediated by cytokines that point to different cell types and stimulating the production of prostaglandins and MMPs, which are associated with bone and connective tissue breakdown.<sup>21</sup>

The literature supports the evidence that SNPs play an important role in the transcription of these inflammatory mediators and may influence the osseointegration success,<sup>11-29</sup> including single-nucleotide polymorphism (SNPs) in MMPs.<sup>8-10</sup>

An important point to validate the association between polymorphism and pathological processes is a methodological and study design restricted.<sup>24,25</sup> In this study, we observed a number of volunteers with reliable estimated statistical power, despite put out smokers—smoking is a strong risk factor for early implant failure.<sup>26</sup> In addition, others risk factors with age, status periodontal, medically compromised, and position implant<sup>27</sup> were exclude or matched.

We confirmed a strong association between MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) SNPs isolated and implant loss. The 2G/2G of MMP-1 and the T/T of MMP-8 genotype were more frequent in the test group. Patients bearing theses genotypes and 2G or T allele seem to be more likely to have implant loss, theses alleles are a risk factor to osseointegration failure. In fact, the 2G allele was shown to augment transcriptional activity and can potentially increase the level of protein expression.<sup>28</sup> In addition, the MMP-8 level in peri-implant sulcular fluid is associated with

**TABLE 2** Allele and Genotype Frequencies of Genes MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 a > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750), and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058) in the Control and Case Groups

Gene	SNPs	Control group	Case group	P value	OR × (95%CI)
MMP-8 (rs11225395)	Allele	n = 200	n = 200		
	C	40% (80)	24.5% (49)	0.0013	0.49 (0.32–0.75)
	T	60% (120)	75.5% (151)		
	Genotype	n = 100	n = 100		
	C/C	16% (16)	12% (12)	0.0005	0.33 (0.19–0.59)
	C/T	48% (48)	25% (25)		
MMP-1 (rs1144393)	T/T	36% (36)	63% (63)		
	Allele	n = 200	n = 200		
	A	59.5% (119)	65.5% (131)	0.2559	0.77 (0.52–1.16)
	G	40.5% (81)	34.5% (69)		
	Genotype	n = 100	n = 100		
	A/A	32% (32)	46% (46)	0.0679	0.55 (0.31–0.98)
MMP-1 (rs1799750)	A/G	55% (55)	39% (39)		
	G/G	13% (13)	15% (15)		
	Allele	n = 200	n = 200		
	1G	78.5% (157)	62% (124)	0.0005	2.24 (1.44–3.48)
	2G	21.5% (43)	38% (76)		
	Genotype	n = 100	n = 100		
MMP-3 (rs3025058)	1G/1G	63% (63)	33% (33)	0.0001	3.46 (1.93–6.19)
	1G/2G	31% (31)	58% (58)		
	2G/2G	06% (06)	09% (09)		
	Allele	n = 200	n = 200		
	5A	40.5% (81)	47% (94)	0.2265	0.77 (0.52–1.14)
	6A	59.5% (119)	53% (106)		
MMP-3 (rs3025058)	Genotype	n = 100	n = 100		
	5A/5A	18% (18)	20% (20)	0.2412	0.88(0.43–1.78)
	5A/6A	45% (45)	54% (54)		
	6A/6A	37% (37)	26% (26)		

Significant values shown in gray.

**TABLE 3** Haplotype Frequencies Considering SNPs MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 a > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750), and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058) in Case and Control Groups

	Haplotype	Total frequency	Case frequency	Control frequency	P-value	OR (95%CI)	Bonferroni correction <sup>a</sup>
1	C-A-G-6A	0.2150	0.0450	0.170	0.00010	0.23 (0.11–0.49)	0.0016
2	C-G-G-6A	0.1350	0.0150	0.120	0.00010	0.11 (0.03–0.38)	0.0016
3	T-A-GG-5A	0.1900	0.1750	0.015	0.00010	13.93 (4.21–46.11)	0.0016
4	T-G-GG-6A	0.0950	0.0050	0.090	0.00020	0.05 (0.01–0.38)	0.0032
5	T-G-G-6A	0.3000	0.2150	0.085	0.00050	2.95 (1.62–5.38)	
6	T-A-G-5A	0.3050	0.0950	0.210	0.00220	0.39 (0.22–0.71)	
7	T-G-GG-5A	0.0700	0.0050	0.065	0.00280	0.07(0.01–0.56)	
8	G-A-G-5A	0.0800	0.0150	0.065	0.02170	0.22 (0.06–0.78)	
9	C-A-GG-5A	0.0900	0.0700	0.020	0.03000	3.69 (1.19–11.41)	
10	C-A-GG-6A	0.0550	0.0450	0.010	0.06660		
11	T-A-G-6A	0.2650	0.1600	0.105	0.14030		
12	T-G-G-5A	0.0800	0.0500	0.030	0.44400		
13	C-G-GG-6A	0.0150	0.0000	0.015	0.24640		
14	C-G-G-5A	0.0250	0.0250	0.000	0.07180		
15	T-A-GG-6A	0.0500	0.0500	0.000	0.00390		
16	C-G-GG-5A	0.0300	0.0300	0.000	0.03970		

<sup>a</sup> After Bonferroni correction, P limit is 0.003

OR, odds ratio; CI, confidence Interval. Significant values shown in gray.



**TABLE 4** Linkage Disequilibrium Between the SNPs: MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058)

SNPs	MMP-8 (–779)	MMP-1 (–519)	MMP-1 (–1607)	MMP-3 (–1612)
MMP-8 (rs11225395)	X	D' = 0.0774	D' = 0.0672	D' = 0.1971
MMP-1 (rs1144393)	P = 0.197	X	D' = 0.2366	D' = 0.2219
MMP-1 (–1607) (rs1799750)	P = 0.527	P = 0.042	X	D' = 0.2568
MMP-3 (–1612) (rs3025058)	P = 0.010	P = 0.008	P = 0.000	X

Significant values of P and D' shown in gray.

**TABLE 5** Multiple Logistic Regression Considering SNPs as independent variables Using Codominant, Dominant, and Recessive model

	SNPs	Genotype	z value	P value
Codominant model	Intercept		2.716	0.0066
	MMP-8 (rs11225395)	CC x CT x TT	–5.789	7.07e-09
	MMP-1 (rs1144393)	AA x AG x GG	0.293	0.7697
	MMP-1 (rs1799750)	1G x 2G x 2G2G	4.331	1.49e-05
	MMP-3 (rs3025058)	5A5A x 5A6A x 6A6A	–0.579	0.5627
Dominant model	Intercept		2.457	0.0140
	MMP-8 (rs11225395)	CC x CT + TT	–2.138	0.0325
	MMP-1 (rs1144393)	GG x AA + AG	0.290	0.7718
	MMP-1 (rs1799750)	2G2G x 1G2G + 1G1G	0.943	0.3457
	MMP-3 (rs3025058)	5A5A x 5A6A + 6A6A	–0.145	0.8850
Recessive model <sup>a</sup>	Intercept		1.300	0.194
	MMP-8 (rs11225395)	TT x CT + CC	5.407	6.41e-08
	MMP-1 (rs1144393)	AA x AG + GG	–0.032	0.974
	MMP-1 (rs1799750)	1G1G x 1G2G + 2G2G	–4.334	1.47e-05
	MMP-3 (rs3025058)	6A6A x 5A6A + 5A5A	–0.205	0.838

<sup>a</sup> MMP-9 was excluded in recessive model. Because it had no TT genotype.

diagnosis of mucositis and peri-implantitis in an early stage.<sup>29</sup> Thus, these alleles can provide molecular basis for a more intense degradation of extracellular matrix, with excessive digest the collagen fibers, which might impair the tissue remodeling process and also deregulate the signaling pathways and bone cell action.

In this population, the MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393) and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058) SNPs isolated were not risk factor to implant loss, corroborating with previous result. This implies that influence of these SNPs isolated in osseointegration process is not significant. However, a combination of several SNPs act synergistically may increase significant risk to failure. In addition, it is important to consider that some SNPs may have their effects masked by another more highly significant. Haplotype is a group of alleles that are inherited together. In this context, haplotype analysis is very important to identify the correct association between SNPs and implant loss.

This is the first study investigating the association between haplotype SNPs in MMPs and implant loss. The haplotype analysis showed a significantly increased risk to implant loss in haplotype T-A-GG-5A, and a protective effect of haplotype and C-A-G-6A, C-G-G-6A, after Bonferroni correction ( $P < 0.003$ ). This indicate that MMP-1, MMP-3, and MMP-8 SNP are additive risk factors in osseointegration.

Based on the results of allelic and genotype frequencies, we have conducted multiple logistic regressions using codominant, dominant, and recessive model. The results showed that the polymorphisms MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) and MMP-1 g.-1607 G > GG

(rs1799750) have an independent and synergistic risk effect in implant loss. In recessive model, which was grouped a normal homozygous vs unusual homozygous added polymorphic heterozygous, the 2G allele in MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) may indicate an increased risk, already the presence of the C allele in MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) may indicate an increase in protective implant loss.

We showed that polymorphisms in different MMPs isolated and in haplotypes are a risk factor to early implant loss; suggesting that osseointegration dependent of the cumulative effect of interactions of sequence variants in MMPs gene with significant biologic pathways.

## 5 | CONCLUSION

The results of this study showed that MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) SNPs individually influence implant loss, and that the presence of the 2G allele in MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) is risk factor, whereas the C allele in MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395) is protective factor. In addition, the haplotype MMP-8 g.-799 C > T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A > G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G > GG (rs1799750) and MMP-3 g.-1612 5A > 6A (rs3025058) is a risk factor of osseointegrated implant failure.


## ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Silvio Sanches Veiga for his assistance. This work was supported by CNPq (grant 40001016007P8).

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interests.

## ORCID

Maria Cristina Leme Godoy dos Santos  <http://orcid.org/0000-0002-0507-1604>

## REFERENCES

- Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105(7):2075-2089.
- Choi JY, Sim JH, Yeo IL. Characteristics of contact and distance osteogenesis around modified implant surfaces in rabbit tibiae. *J Periodontal Implant Sci*. 2017;47(3):182-192.
- Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:74-87.
- Kivela-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, et al. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontol Res*. 2003;38(6):583-590.
- Ma J, Kitt U, Hanemaaijer R, et al. Gelatinase B is associated with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(6):709-713.
- Thierbach R, Maier K, Sorsa T, Mäntylä P. Peri-implant sulcus fluid (PISF) matrix metalloproteinase (MMP) -8 levels in Peri-Implantitis. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(5):ZC34-ZC38.
- Ghigbi M, Llorens A, Baroukh B, Chaussain C, Bouchard P, Gosset M. Differences between inflammatory and catabolic mediators of peri-implantitis and periodontitis lesions following initial mechanical therapy: an exploratory study. *J Periodontol Res*. 2018;53(1):29-39.
- Santos MC, Campos MI, Souza AP, Trevilatto PC, Line SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004;19(1):38-43.
- Leite MF, Santos MC, de Souza AP, Line SR. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(4):653-658.
- Costa-Junior FR, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC, de Souza AP, Santos MC. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Invest*. 2013;17(1):311-316.
- Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant Dent*. 2014;23(6):723-731.
- Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, et al. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015;15:33.
- Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, et al. An exploratory case-control study on the impact of IL-1 gene polymorphisms on early implant failure. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(2):234-240.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017 Sep/Oct;32(5):e241-e248.
- Sampaio Fernandes M, Vaz P, Braga AC, Sampaio Fernandes JC, Figueiral MH. The role of IL-1 gene polymorphisms (IL1A, IL1B, and IL1RN) as a risk factor in unsuccessful implants retaining overdentures. *J Prosthodont Res*. 2017;61(4):439-449.
- Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000;18(1):6-9.
- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccalepithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-152.
- Munhoz FBA, Nogara PRB, Costa-Junior FR, Branco FP, Santos MCLG. Analysis of MMP-3 polymorphism in osseointegrated implant failure. *Braz J Oral Sci*. 2016;15:4.
- R Core Team R. *A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. 2015.
- Seymour GJ, Gemmell E, Lenz LJ, Henry P, Bower R, Yamazaki K. Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(3):191-198.
- Greenstein G, Hart TC. Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation. *J Am Dent Assoc*. 2002;133:452-459.
- Montes CC, Alvim-Pereira F, De Castilhos BB, Sakurai ML, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20:208-217.
- Dirschnebel AJ, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Bernardino JF, Rosa EA, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22:1235-1241.
- Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(7):775-788.
- Liao J, Li C, Wang Y, et al. Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure. *Mol Biol Rep*. 2014;41(5):2789-2798.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(1):527-551.
- Lin G, Ye S, Liu F, He F. A retrospective study of 30,959 implants: risk factors associated with early and late implant loss. *J Clin Periodontol*. 2018;45:733-743.
- Nishioka Y, Kobayashi K, Sagae S, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. 2000;91(6):612-615.
- Aleksandrowicz P, Zelechowska P, Agier J, et al. Evaluation of Metalloproteinase-8 levels in Crevicular fluid of patients with healthy implants or periodontitis. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4920847.

**How to cite this article:** de Araujo Munhoz FB, Branco FP, Souza RLR, dos Santos MCLG. Matrix metalloproteinases gene polymorphism haplotype is a risk factor to implant loss: A case-control study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;1-6. <https://doi.org/10.1111/cid.12671>



## 7. CAPÍTULO III - ARTIGO PUBLICADO

Título: ***MMP-13 polymorphism as a risk factor early implant loss.***

Data da publicação: Fevereiro, 2019.

Periódico: *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants.*

ISSN: 0882-2786

Fator de impacto: 1.699

Qualis Capes – Área de avaliação: Ciências Biológicas II

Classificação: B2

Qualis Capes – Área de interesse: Odontologia

Classificação: A2

## MMP-13 Polymorphism as a Risk Factor in Implant Loss

Francielle Boçon de Araujo Munhoz<sup>1</sup>/Filipe Polese Branco, PhD<sup>2</sup>/  
Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza, PhD<sup>3</sup>/Maria Cristina Leme Godoy dos Santos, PhD<sup>4</sup>

**Purpose:** To investigate whether MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) gene polymorphism is associated with early implant loss. **Materials and Methods:** Two hundred nonsmoking volunteers in good oral health, > 18 years of age, and found to be periodontally healthy by clinical examination were matched by age, sex, and implant position and separated into two groups: control group (100 patients with one or more healthy implants for a minimum of 1 year) and test group (100 patients who had suffered early implant loss, considered when implants presented mobility and/or pain before or during abutment connection, requiring their removal). Genomic DNA from saliva was genotyped by PCR-RFLP. Statistical analysis of the results was done using Mann-Whitney U and chi-square tests, with a significance level of 5%. **Results:** A significant difference in the presence of the different alleles and genotype was found between groups for the MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) gene polymorphism ( $P = .0161$ , OR 95% = 0.57 [0.37 to 0.89];  $P = .007$ , OR 95% = 0.44 [0.25 to 0.78]). The A allele increased susceptibility to early implant loss and appeared to be a genetic risk factor. **Conclusion:** The findings suggest that MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) polymorphism may contribute to early implant loss. *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS* 2019;34:XXX-XXX. doi: 10.11607/jomi.7057

**Keywords:** implant loss, metalloproteinase, polymorphism, risk factor

One major challenge of modern implant dentistry is to comprehend the implant loss that tends to cluster into subsets of individuals. Despite the high clinical success rate and an implant permanence of more than 95% in the first 10 years, some patients present failures during the osseointegration process, culminating in implant loss.<sup>1,2</sup> In the majority, early failure occurs, due to unsuccessful osseointegration, indicating impaired bone healing.

Early implant loss is a multifactorial condition depending on several extrinsic and intrinsic risk factors, such as age, sex, smoking, medical pre-conditions,

bone quality, implant characteristics, and position.<sup>3,4</sup> However, some losses occur without a clinically recognized mechanism or causes. These findings suggest a crucial impact of genetic influence on osseointegration.

Nowadays, some research is answering questions concerning the role of genetics in implant loss. In this context, single nucleotide polymorphisms (SNPs), the most common form of DNA variation, have been investigated in recent years. Some SNPs in cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs) gene already were associated with implant loss and peri-implantitis,<sup>5-12</sup> which explains some of the inter-individual risk factors.

MMPs are an important class of endopeptidase enzymes secreted by local cells to degrade all substrates of the extracellular matrix and its components. Among this family of enzymes, the subgroup of collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13) plays a crucial role in tissue remodeling. MMP-13, or collagenase-3, is capable of degrading aggrecan, gelatin, and all collagen molecules, especially fibrillar collagens,<sup>13</sup> an essential component in the formation of new bone matrix and in the integration of the implant surface to the surrounding bone.

Although the sequences of the 3.2 billion bases of human DNA are more than 99.9% identical, sequence variations (polymorphisms) contribute to biologic variation and affect how humans develop diseases. Some genetic polymorphisms (SNPs) may affect gene

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Curitiba-PR, Brazil.

<sup>2</sup>Institute of Postgraduate and Research in Dentistry (IPPO), Implantology, Balneário Camboriú-SC, Brazil.

<sup>3</sup>Professor, Department of Genetics, University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Curitiba-PR, Brazil.

<sup>4</sup>Professor, Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Curitiba-PR, Brazil.

**Correspondence to:** Dr Maria Cristina Leme Godoy Santos, Department of Cell Biology, University Federal of Paraná, Centro Politécnico, Rua Francisco H. dos Santos, Jd. das Américas, 81531-990, Curitiba-PR, Brazil.  
Fax: + 55-041-3266-2042. Email: lemegsantos@gmail.com

Submitted March 21, 2018; accepted September 25, 2018.

©2019 by Quintessence Publishing Co Inc.



expression levels and protein production or functions; consequently, they influence osteogenesis and inflammatory responses. Some SNPs in cytokines and lipid mediator genes were associated with implant loss and peri-implantitis, explaining some of the inter-individual risk factors.

The MMP-13 gene has a functional SNP characterized by the exchange of the A to G in -77 positions on the gene, which has already been related to various pathologies, including different cancers,<sup>14</sup> aneurysms,<sup>15</sup> disc degeneration,<sup>16</sup> tendinopathy,<sup>17</sup> dental agenesis,<sup>18</sup> and caries.<sup>19</sup>

Considering that MMP-13 is one of the important factors in the bone remodeling process and studies in this area are scarce, the present study investigated the contribution of MMP-13 g. -77 A > G (rs2252070) SNP to evaluate the risk for early implant loss.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

This was a case-control study; the Ethical Committee in Research CEP/SD-PB CAAE: 54921616.0.0000.0102 approved the study protocol. This study followed the guidelines of the Helsinki Declaration.

Two hundred nonsmoker volunteers were recruited in three pools of dental clinics from the South and Southeast of Brazil (Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba, São Paulo; Latin American Institute for Dental Research, Paraná; and Institute of Postgraduate and Research in Dentistry, Santa Catarina). The implant loss rate (early and later) of these centers was less than 3%. Patients who had suffered early implant loss, agreed to participate in the study, and did not have any of the exclusion criteria were included. The control group was composed of volunteers without implant loss, matched by age, sex, and implant number and position selected from the same dental clinics, presenting for a minimum of 1 year of implant function.

The three clinics used 90% Neodent implants and 10% other brands, according to clinical indication and cost.

All volunteers were in good general and oral health, nonsmoking, > 18 years of age, and found to be periodontally healthy by clinical examination. Patients with diabetes, osteoporosis, HIV infection, hepatitis, immunosuppressive chemotherapy, or severely compromised immune function were excluded. Participants who have had postsurgical infection were also excluded.

Participants were divided into a control group, 100 patients with one or more healthy implants for a minimum period of 1 year; and a test group, 100 patients who had suffered one or more early implant

losses. Healthy implants were considered by evaluating implant immobility, health of peri-implant tissues (including the extent of bone loss, pocket depth, and bleeding on probing), function, and comfort of the patient. Diagnostic criteria used for the assessment of implant loss was presenting mobility and/or pain before or during the abutment connection, requiring removal. All patients with early implant loss in the study period who agreed to participate and did not have any of the exclusion criteria were selected.

### Genotyping

DNA was extracted from epithelial buccal cells,<sup>20</sup> and the concentration (ng/μL) was quantified by optical density 260/280 nm ratio greater than 1.9.

The MMP-13 g. -77 A > G (rs2252070) polymorphism had previously been identified with minor allele frequencies greater than 0.3 in the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

PCR-RFLP assay determined the MMP-13 genotype, with approximately 200 ng of DNA, 200 nmol of each PCR primer (forward 5'-GATACGTTCTTACAGAAGGC-3' and reverse 5'-GACAAATCATCTTCATCACC-3'), and 1 unit of Go Taq Green PCR Master Mix (Promega). Amplification was carried out with 35 cycles at 94°C, 50°C, and 72°C for 1 minute. One unit of BsrI (BseNI) enzyme digested 10 μL of PCR products at 65°C overnight. These products were electrophoresed on a 2% agarose gel at 20 mA and stained by GelRed (Biotium).

### Statistical Analysis

The Mann-Whitney *U* test was used to determine any significant differences between age, sex, and implant position of both groups. Both groups showed similar mean ages, as follows: mean 49 ± 10.1 years (range: 18 to 76 years) for the control group and 49.2 ± 11.2 years (range: 20 to 80 years) for the test group (*P* = .08). Each group had 65% women, 61% maxillary implants, and a mean 4.6 implants by volunteers. In both groups, 90% used Neodent implants.

Chi-squared test, with *P* < .05, was used to differentiate frequencies of polymorphism between both groups. Hardy-Weinberg equilibrium was conducted using PHASE software (<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>).

## RESULTS

Genotype distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium. In the present study, MMP-13 rs2252070 A/G polymorphism had significant differences in the frequencies of alleles and genotypes between groups



**Table 1** Allele and Genotype Frequencies of Genes MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) in Control and Test Groups

Gene/SNPs	Control group	Test group	P value	OR (95% CI)
<b>MMP-13 (rs2252070)</b>				
<b>Allele</b>	n = 200	n = 200		
A	64.5% (129)	76% (152)	.0161	0.57 (0.37–0.89)
G	35.5% (71)	24% (48)		
<b>Genotype</b>	n = 100	n = 100		
A/A	36% (36)	56% (56)	.007	0.44 (0.25–0.78)
A/G	57% (57)	40% (40)		
G/G	07% (7)	04% (04)		

Values are expressed in percentage, with the number of participants (n) in parentheses.

(Table 1). In the test group, the A allele and A/A genotype were found in 76% and 56%, while in the control group, the same allele and genotype were found in 64.5% and 36% ( $P = .0161$ ; OR 95% 0.57 [0.37 to 0.89] and  $P = .007$ ; OR 95% 0.44 [0.25 to 0.78], respectively).

## DISCUSSION

Bone remodeling in implant osseointegration is a dynamic process that depends on the correct balance between resorption and deposition of bone, which must be firmly combined quantitatively, in time and in space.<sup>21</sup> It should be stressed that this continuous process of bone remodeling ensures long-term implant functionality. Bone turnover processes are regulated by various humoral factors, including a significant role of MMPs.

MMPs interfere in local bone metabolism and are involved in the destruction of connective tissues. The recent literature has shown that MMPs are present in peri-implant sulcular fluid and levels, and molecular forms of MMPs can play a pathologic role in bone loss.<sup>22–26</sup> In addition, increased inflammation in combination with the production of MMPs leads to the destruction of periodontal tissue.<sup>25</sup> Specific increased MMP-13 activity in gingival fluid was associated with progressive periodontal disease,<sup>27</sup> supporting this MMP role in alveolar bone loss.

The present study evaluated a SNP in a heterogeneous and miscegenational Brazilian population, which have significantly overlapping genotypes.

Thus, the results reported here should be tested in other populations.

A strong association of MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) SNP with early implant loss was identified in this case-control cross-sectional study. Patients bearing A/A genotypes or A allele appear more probable to have implant loss. The transcriptional activity of

A allele was found to be two times higher than the G in MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) SNP.<sup>28</sup> Thus, it is considered that this allele potentially alternates the protein expression and influences the process of implant loss, making the extracellular matrix degradation more intense, with excessive collagen fiber breakdown. It might impair the tissue remodeling process and also deregulate signaling pathways and bone cell action.

In previous studies, the present authors also showed association between polymorphism in other collagenases (MMP-1 and MMP-8) and early implant loss.<sup>6–8</sup> Therefore, it is reasonable to postulate that MMP polymorphisms, mainly in collagenase genes, may play a crucial role in early implant loss.

An important point in validating the association between polymorphism and pathologic processes is a restricted methodologic and study design. The present study observed a number of volunteers with reliable estimated statistical power, despite exclusion or matched risk factors with age, periodontal status, medically compromised, implant position, and smoking.

This makes the results more robust and showed that MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) polymorphism alone is a risk factor for early implant loss. Interestingly, this same SNP was not associated with peri-implantitis.<sup>29</sup> Nevertheless, nonrestricted criteria for inclusion of volunteers, for example, smoker participants, would possibly mask the genetic influence.

Since that intensity of the inflammation surrounding implants is an important pathophysiologic factor in osseointegration,<sup>30</sup> it seems important to investigate SNPs in different regions of MMP gene or other genes involved with periodontal inflammatory mediators, which may be an act synergistically in combination in osseointegration.

The genetic identification of individuals at higher risk of implant loss can contribute to strategies of modulation of the genetic markers and ensure appropriate and individual implant treatment.



## CONCLUSIONS

MMP-13 g.-77 A > G (rs2252070) polymorphism might increase implant loss susceptibility, indicating that this polymorphism could be a potential diagnostic and prognostic factor for early implant loss.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq (grants 40001016007P8). The authors thank Dr Silvio Sanches Veiga for his assistance. The authors affirm that they have no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Fischer K, Stenberg T. Prospective 10-year cohort study based on a randomized controlled trial (RCT) on implant-supported full-arch maxillary prostheses. Part 1: Sandblasted and acid-etched implants and mucosal tissue. *Clin Implant Dent Relat Res* 2012;14:808–815.
- Buser D, Sennerby L, De Bruyn H. Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions. *Periodontol* 2000 2017;73:7–21.
- Chrcanovic BR, Albrektsson T, Wennerberg A. Reasons for failures of oral implants. *J Oral Rehabil* 2014;41:443–476.
- May MC, Andrews PN, Daher S, Reebye UN. Prospective cohort study of dental implant success rate in patients with AIDS. *Int J Implant Dent* 2016;2:20.
- Santos MC, Campos MI, Souza AP, Trevilatto PC, Line SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:38–43.
- Leite MF, Santos MC, de Souza AP, Line SR. Osseointegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:653–658.
- Costa-Junior FR, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC, de Souza AP, Santos MC. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Invest* 2013;17:311–316.
- Pigossi SC, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM. Association of interleukin 4 gene polymorphisms with dental implant loss. *Implant Dent* 2014;23:723–731.
- Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, et al. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: A cross-sectional study. *BMC Oral Health* 2015;11:15:33.
- Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, et al. An exploratory case-control study on the impact of IL-1 gene polymorphisms on early implant failure. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016;18:234–240.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2017;32:e241–e248.
- Sampaio Fernandes M, Vaz P, Braga AC, Sampaio Fernandes JC, Figueiral MH. The role of IL-1 gene polymorphisms (IL1A, IL1B, and IL1RN) as a risk factor in unsuccessful implants retaining overdentures. *J Prosthodont Res* 2017;61:439–449.
- Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. *Adv Clin Exp Med* 2016;25:383–390.
- Gao P, Yang JL, Zhao H, You JH, Hu Y. Common polymorphism in the MMP-13 gene may contribute to the risk of human cancers: A meta-analysis. *Tumour Biol* 2014;35:10137–10148.
- Saracini C, Bolli P, Sticchi E, et al. Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2012;55:171–179.
- Rajasekaran S, Kanna RM, Senthil N, et al. Phenotype variations affect genetic association studies of degenerative disc disease: Conclusions of analysis of genetic association of 58 single nucleotide polymorphisms with highly specific phenotypes for disc degeneration in 332 subjects. *Spine J* 2013;13:1309–1320.
- de Araujo Munhoz FB, Baroneza JE, Godoy-Santos A, et al. Posterior tibial tendinopathy associated with matrix metalloproteinase 13 promoter genotype and haplotype. *J Gene Med* 2016;18:325–330.
- Antunes LS, Küchler EC, Tannure PN, et al. Genetic variations in MMP9 and MMP13 contribute to tooth agenesis in a Brazilian population. *J Oral Sci* 2013;55:281–286.
- Tannure PN, Küchler EC, Falagan-Lotsch P, et al. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. *Caries Res* 2012;46:401–407.
- Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dental J* 2007;18:148–152.
- Parithimarkalaigan S, Padmanabhan TV. Osseointegration: An update. *J Indian Prosthodont Soc* 2013;13:2–6.
- Kivela-Rajamäki M, Maisi P, Srinivas R, et al. Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid. *J Periodontol Res* 2003;38:583–590.
- Ma J, Kittl U, Hanemaaijer R, et al. Gelatinase B is associated with peri-implant bone loss. *Clin Oral Implants Res* 2003;14:709–713.
- Thierbach R, Maier K, Sorsa T, Mantyla P. Peri-implant sulcus fluid (PISF) matrix metalloproteinase (MMP)-8 levels in peri-implantitis. *J Clin Diagn Res* 2016;10:ZC34–ZC38.
- Aleksandrowicz P, Żelechowska P, Agier J, et al. Evaluation of metalloproteinase-8 levels in crevicular fluid of patients with healthy implants or periodontitis. *Mediators Inflamm* 2017;2017:4920847.
- Ghigbi M, Lorens A, Baroukh B, Chaussain C, Bouchard P, Gosset M. Differences between inflammatory and catabolic mediators of peri-implantitis and periodontitis lesions following initial mechanical therapy: An exploratory study. *J Periodontol Res* 2018;53:29–39.
- Leppilähti JM, Hernández-Ríos PA, Gamonal JA, et al. Matrix metalloproteinases and myeloperoxidase in gingival crevicular fluid provide site-specific diagnostic value for chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2014;41:348–356.
- Yoon S, Kuivaniemi H, Gatalica Z, et al. MMP13 promoter polymorphism is associated with atherosclerosis in the abdominal aorta of young black males. *Matrix Biol* 2002;21:487–498.
- Gonçalves Junior R, Pinheiro Ada R, Schoichet JJ, et al. MMP13, TIMP2 and TGFβ3 gene polymorphisms in Brazilian chronic periodontitis and periimplantitis subjects. *Braz Dent J* 2016;27:128–134.
- Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: A paradoxical relationship. *J Dent Res* 2011;90:1052–1061.



## 8. CAPÍTULO IV - ARTIGO EM PROCESSO DE SUBMISSÃO

### ROLE OF MMP-2 AND MMP-9 POLYMORPHISM IN DENTAL IMPLANT LOSS

Francielle Boçon de Araujo Munhoz<sup>1</sup>, Filipe Polese Branco<sup>2</sup>, Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza<sup>3</sup>, Maria Cristina Leme Godoy dos Santos<sup>4</sup>

<sup>1</sup>PHD student, Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>2</sup>PHD, Institute of Postgraduate and Research in Dentistry (IPPO), Balneário Camboriú, SC, Brazil.

<sup>3</sup>PHD, Professor Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>4</sup>PHD, Professor Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

Corresponding author:

Maria Cristina Leme Godoy Santos

Federal University of Paraná, Centro Politécnico, Rua Francisco H. dos Santos, Jd. das Américas, 81531-990, Curitiba PR, Brazil.

e-mail: lemegsantos@gmail.com

## Abstract

**Background an Objective:** This association study sought to unravel the relationship the polymorphism MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) and MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) and the early loss of the osseointegrated dental implant.

**Material and Methods:** Subjects non-smokers and healthy were divided into control and case groups, 100 patients who presented healthy implants and 100 patients who presented early implant failures, respectively, both within one year. DNA obtained from oral epithelial cells were amplified and genotyped using the PCR-RFLP assays. The Chi-square test, considering the significant value of  $p < 0.05$ , was used to analyze the genotypes and alleles of all patients.

**Results:** Statistical analysis showed significance in genotype and allele frequencies of MMP-2 g-1306 C>T (rs243865) ( $p < 0.001$ ) in the case and control groups. The multiple logistic regression model (CC x TC + TC) ( $p = 3.89e-05$ ) was significant in the early implant loss during the osseointegration. However, no evidence of a significant relationship was found in the polymorphism MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) and implant loss.

**Conclusion:** The polymorphic gene of MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) individually influences the implant loss, T allele represents a protection factor during the osseointegration. The MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) polymorphism does not appear to influence the failure of the osseointegrated dental implant. The elucidation of the role of MMP SNPs in the early implant loss, may contribute to the recognition of risk patients, assist in the development of strategies for modulating genetic markers, and ensure adequate and individualized treatment.

**Keywords:** Osseointegration, Gene Polymorphism, Matrix Metalloproteinase, Dental implant, Implant loss, Gelatinase.

## Introduction

Various extrinsic and intrinsic factors have been proposed to explain the multifactorial etiology of implant loss. The literature show that multiple implant failures can be occur in the same subject, supporting the evidence that individual's host response play an important role in the failure process.

In this context, some research evaluates the genetic influence in the osseointegration. In last years has been investigated the participation of single nucleotide polymorphisms (SNPs), the most common form of DNA variation, in implant loss. SNPs may affect gene expression levels and protein production or functions; consequently, they can alter osteogenesis and inflammatory responses. Some SNPs in different genes, like matrix metalloproteinases (MMPs), have already been associated with implant loss and peri-implantitis<sup>1-6</sup>.

MMPs are the major class of enzymes capable of cleaving all extracellular matrix substrates and also regulate cell behavior and signaling pathways towards remodeling of tissue<sup>7</sup>, including in implant osseointegration. In fact, bone lining cells digest the collagen fibers mediated by MMPs and clean the bone surface in order to facilitate remodeling, in early stages of osseointegration<sup>8</sup>. Moreover bone cells and fibroblast synthesize and release MMPs during all their activity in osseointegration process<sup>8</sup>.

Among the MMPs, the MMP-2 and MMP-9 (gelatinase-A and -B) are produced by endothelial cell, fibroblasts, inflammatory cells, and bone cells<sup>9</sup> and interfere in local bone metabolism as well as being involved in the destruction of connective tissues<sup>10</sup>.

The MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) SNP modifies the promoter activity of the MMP-2 gene, altering the Sp1-type promoter site leads to significantly lower transcriptional activity (the T allele has a markedly 50% lower activity than the C allele)<sup>11</sup>. In MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) SNP the T allele has been reported to increase promoter activity by almost 2-fold<sup>12</sup>. The MMP-2 and MMP-9 gene is crucial for the regulation of extracellular matrix components, and theses dysregulation could be associated with the development of implant failure.

Besides, MMP-2 and MMP-9 SNPs as well as haplotypes were often adapted as disease biomarkers for the treatment of head and neck squamous cell



carcinoma<sup>13</sup>. This SNPs has been associated with spontaneous abortion<sup>14</sup>, hepatopulmonary syndroms<sup>15</sup>, oral cancer<sup>16</sup> and optic neuritis<sup>17</sup>.

Considering that gelatinases are one of the important factors in the bone remodeling process, the present study investigate the contribution of MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) and MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) SNPs to evaluating the risk for early implant loss.

## **Material and Methods**

The subjects that participated in this case-control association study freely agreed and signed a free and informed consent form, according to a project approved by the Research Ethics Committee: CEP / SD-B CAAE: 54921616.0.0000.0102. The guideline of the Declaration of Helsinki was followed.

Two hundred non-smokers volunteers were recruited in three pool of Dental Clinics from South and Southeast of Brazil (Dental Clinics of the Faculty of Dentistry of Piracicaba, São Paulo; Latin American Institute for Dental Research, Paraná and Institute of Postgraduate and Research in Dentistry, Santa Catarina), whose rate of early and late loss of the implants is less than 3%. The three clinics used 90% of Neodent® implants and 10% of other brands, as indicated by the professional and patient choice.

The volunteers were > 18 years of age and presented a good state of oral and systemic health. Were excluded patients with diabetes, hepatitis, HIV infection, immunosuppressive chemotherapy, osteoporosis or severely compromised immune function. It also excluded volunteers that have had infection postsurgical, precocious prosthesis load or regenerative surgery. All volunteers have a transgingival healing concept performed.

Subjects were divided into two groups: test group, 100 volunteers that had suffered one or more early implant failures with mobility and/or pain before or during the abutment connection and needed to be removed; and control group, 100 volunteers, matched to test group by gender, age and implant number and position, presenting at least one implant in function for a minimal than 1 year and without any implant loss. Healthy implant was considered evaluating implant immobility, health of periimplant tissues (including the extent of bone loss, pocket depth and bleeding on probing), function and comfort of patient.

These strict criteria in obtaining the samples aim to reduce the influence of systemic factors in the loss of the implant, to analyze the influence of the SNPs.

### **DNA sample and Genotyping**

Total DNA was obtained from buccal epithelial cells with ammonium acetate<sup>18</sup>. The concentration of DNA (ng/μL) estimated by measurements of optical density 260/280 nm ratio greater than 1.9. The SNPs had previously been identified and included in the database of the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). The global minor allele frequency of MMP-2 is 0.1366 and of MMP-9 is 0.1552.

The MMPs genotypes were determined using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assays (PCR-RFLP). The final volume of PCR was 15μl, containing 100ng of genomic DNA, 1 unit of Go Taq® Green PCR Master Mix (Promega Corporation. - St. Madison, USA) and 200nmol of specific primer. An 8μl aliquot of PCR products was then digested with 1 unit of specific enzyme (Restriction Enzymes Thermo Scientific® - Fermentas Life Science. - St. Lithuania, UE) overnight and electrophoresed on 8% acrylamide gel (MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865)) or 2% agarose gel (MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242)) at 20mA and stained by GelRed® Nucleic Acid Stain (Biotium, Inc. - St. Fremont, USA). The PCR-RFLP conditions are detailed in Table 1.

### **Statistical Analysis**

To compare alleles and genotypes frequencies between cases and controls was applied Chi-square test. The multiple logistic regressions analyses were conducted with R software (R Development Core Team, 2015). Hardy–Weinberg equilibrium was conducted using PHASE software (<http://stephenslab.uchicago.edu/phase/download.html>).

Mann–Whitney U test was used to determine any significant differences between ages, implant position and number of both groups. Both groups showed similar means of age, as follows: 49 years (18–76) for the control group and 49.2 years (20–80) for the test group ( $p=0.08$ ). Each group has 61% maxillary implant, mean of 4.6 implants by volunteers and 65% female.

## Results

All genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium. The study showed that the MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) SNP had a significant differences in the frequencies of alleles and genotypes between test and control groups. The T allele was found in 5% of the test group, and 18.5% of control group, respectively ( $p < 0.001$ , OR 95% 0.23 (0.11-0.48)). The most frequent genotype was C/C in both groups, with frequencies of 91% in the test group and 65% in the control group ( $p < 0.001$ , OR 95% 0.08-0.41)). Considering the MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) SNP the statistical analysis did not show significant differences in the alleles and genotypes between the two sample groups (Table 2).

Different models were tested using multiple logistic regression. The model (C/C x C/T + C/T,  $p = 3.89 \times 10^{-5}$ ) was significant to MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) SNP, suggesting that they are independent variables in implant failure, and that the presence of the T allele is a protective factor for osseointegration.

## Discussion

The expression of MMPs in tissues is highly regulated, involves complex interactions between cell surface receptors and ECM, cytokines and growth factors. Thus, it directly influences bone remodeling and inflammatory processes.

Bone turnover processes are regulated by various humoral factors including a significant role of MMPs. In previous studies, we showed an association between polymorphism in others MMPs (MMP-1, MMP-8 and MMP-13) and early implant loss<sup>5, 6</sup>. Therefore, it is reasonable to postulate that MMP polymorphisms are potential influencers and play a significant role in early implant loss.

Recent literature has shown that the level of MMP -2, -9 requires special attention in oral tissue. High levels and overexpression of these enzymes were observed and analyzed in patients with peri-implantitis and inflammation of the gingival tissue, being that their expression and activation in crevicular gingival fluid increased with the severity and progression of inflammation<sup>19-20</sup>.

In this case–control cross-sectional study, a strong association MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) SNP with early implant loss was identified. Patients bearing C/C genotypes or C allele appear more probable to have implant loss. The transcriptional activity of C allele was higher than the T, so, we consider that the C allele making more intense the extracellular matrix degradation, with excessive collagen fibers



breakdown. It might impair the tissue remodeling process and also deregulate signaling pathways and bone cell action.

Although studies have shown that the T allele in the MMP-9 -1562 C / T promoter polymorphism may be a protective factor for chronic periodontitis<sup>21</sup>, and that MMP-9 is present in inflammatory gingival tissue and high levels of this enzyme are expressed in oral diseases such as precancerous oral lesions, oral cancer, periodontitis and decreased organic matrix in caries.<sup>44-46</sup> Our study showed that in this population MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) SNP isolated, were not associated with implant failure.

The success of healing equates the active remodeling of cartilages and bone matrices and the combined differentiation and activity of various cell types. The role of tissue in its biophysical environment is influenced by the effect of enzymatic activity on the cells. Thus, such polymorphic alleles may deregulate the transcription of MMPs and impair the normal process of osseointegration.

## **Conclusion**

The results of this study showed that the polymorphic gene of MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) individually influences the early loss of the osseointegrated dental implant. The presence of the T allele in MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) gene (p <0.001) has the protective potential during osseointegration of the dental implant. The MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) SNP was not associated with the risk of failure of the osseointegrated implant.

## **Acknowledgments**

This work was supported by CNPq (grants 40001016007P8). We affirm that have no conflicts of interests.

## References

1. Santos MC, Campos MI, Souza AP; Trevilatto PC, Line SR. Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(1):38-43.
2. Leite MFF, Santos MCLG, Souza AP, Line SRP. Osseintegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519). *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008;23:653-8.
3. Costa-Junior FR, Alvim-Pereira CC, Alvim-Pereira F, Trevilatto PC, de Souza AP, Santos MC. Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure. *Clin Oral Investig* 2013;17(1):311-6.
4. Thierbach R, Maier K, Sorsa T, Mäntylä P. Peri-Implant Sulcus Fluid (PISF) Matrix Metalloproteinase (MMP) -8 Levels in Peri-Implantitis. *J Clin Diagn Res.* 2016 May;10(5):ZC34-8
5. De Araujo Munhoz FB, Branco FP, Souza RLR et al. Matrix metalloproteinases gene polymorphism haplotype is a risk factor to implant loss: A case-control study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2018; 20(6):1003-1008.
6. de Araujo Munhoz FB, Branco FP, Rodrigues Souza RL, Dos Santos MC. MMP-13 Polymorphism as a Risk Factor in Implant Loss. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2019.
7. Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:74-87.
8. Choi JY, Sim JH, Yeo IL. Characteristics of contact and distance osteogenesis around modified implant surfaces in rabbit tibiae. *J Periodontal Implant Sci.* 2017;47(3): 182–92.
9. Sapna G, Gokul S, Bagri-Manjrekar K. Matrix metalloproteinases and periodontal diseases. *Oral Dis.* 2014;20(6):538-50.
10. Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(2):383-90.
11. Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-specific transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7549–58.

12. Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, Watkins H, Henney AM. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1788-94.
13. Luizon MR, de Almeida Belo V. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 polymorphisms and haplotypes as disease biomarkers. *Biomarkers*. 2012;17(3):286-8.
14. Li L, Liu J, Qin S, Li R. The association of polymorphisms in promoter region of MMP2 and MMP9 with recurrent spontaneous abortion risk in Chinese population. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(40):e12561.
15. Liu JW, Chen DQ. Correlations of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms with the risk of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients: A case-control study. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(11):634-642.
16. Tsai CW, Hsu HM, Wang YC, Chang WS, Shih LC, Sun KT, Hung YW, Yang YC, Gong CL, Bau DT. Contribution of MMP2 Promoter Genotypes to Oral Cancer Susceptibility, Recurrence and Metastasis in Taiwan. *Anticancer Res*. 2018;38(12):6821-6826
17. Liutkevičienė R, Vilkevičiūtė A, Banevičius M, Miežytė R, Kriaučiūnienė L. Association of MMP-2 (-1306 C/T) Gene Polymorphism with Predisposition to Optic Neuritis and Optic Neuritis Together with Multiple Sclerosis. *Medicina (Kaunas)*. 2018;54(2).
18. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz. Dent J* 2007;18(2):148 -5.
19. Dong W, Xiang J, Li C, Cao Z, Huang Z. Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis. *J Periodontal Res* 2009; 4:125-132.
20. Maciejczyk M, Pietrzykowska A, Zalewska A, Knaś M, Daniszewska I. The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(2): 383-90.
21. Ajmera DH, Singh P, Zhu Y, et al. A meta-analysis of MMP-9 promoter -1562 C/T polymorphism on susceptibility of chronic periodontitis. *Springerplus* 2016; 26: 5-526.



**Table 1.** PCR-RFLP conditions MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) and MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) polymorphism.

MMP-2 (rs243865)			
Primers (5' to 3') Forward/ Reverse	PCR Annealing Temperature	RFLP Enzyme Temperature	PCR- RFLP Base pairs (pb)
F: CTTCTAGGCTGGTCCTTACT	62°C	<i>FspBI/BfaI</i>	188+5 (allele C)
R: CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAG	60s	37°C	162+26+5 (allele T)
MMP-9 (rs3918242)			
Primers (5' to 3') Forward/ Reverse	PCR Annealing Temperature	RFLP Enzyme Temperature	PCR- RFLP Base pairs (pb)
F: GCCTGGCACATAGTAGGCC	65°C	<i>PaeI/SphI</i>	435 (allele T)
R: CTTCTAGCCAGCCGGCATC	30s	37°C	247+188 (allele C)

**Table 2.** Genotype and allele frequencies of MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) and MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) in the control and case groups.

MMP-2 (rs243865)				
SNP	Control group	Case group	p-value	OR * (95%CI)
Allele	n = 200	n = 200		
C	81.5% (163)	95% (190)		
T	18.5% (37)	5% (10)	<0.0001	0.23 (0.11-0.48)
Genotype	n = 100	n = 100		
C/C	65% (65)	91% (91)		
C/T	33% (33)	8% (8)	<0.0001	0.18 (0.08-0.41)
T/T	2% (2)	1% (1)		
MMP-9 (rs3918242)				
SNP	Control group	Case group	p-value	OR * (95%CI)
Allele	n = 200	n = 200		
C	94% (188)	90.5% (181)	p= 0.2619	1.64 (0.78-3.48)
T	6% (12)	9.5% (19)		
Genotype	n = 100	n = 100		
C/C	88% (88)	81% (81)	p= 0.2411	1.72 (0.79-3.76)
C/T	12% (12)	19% (19)		
T/T	0	0		

## 9. DISCUSSÃO

A etiologia da perda do implante bucal é um processo multifatorial, e vários fatores biológicos, microbiológicos e biomecânicos têm sido propostos para explicá-lo. No entanto, em alguns casos, a causa e o mecanismo da falha do implante ainda são obscuros.

A remodelação óssea durante a osseointegração do implante é um processo dinâmico que depende do correto equilíbrio entre reabsorção e deposição óssea, e que deve ser firmemente combinado quantitativamente, no tempo e no espaço (GREENSTEIN; HART, 2002). Deve-se ressaltar que este processo contínuo de remodelação óssea garante uma funcionalidade de longo prazo ao implante.

O processo de remodelação óssea é regulado por vários mediadores incluindo um papel significativo das MMPs. A expressão de MMPs nos tecidos é altamente regulada e envolve interações complexas entre os receptores da superfície celular e matriz extracelular, além de diversos mediadores como citocinas e fatores de crescimento. Uma resposta imunoinflamatória desequilibrada leva a reabsorção dos tecidos periodontais e periimplantares e estimula uma maior atividade de MMPs, influenciar diretamente a remodelação óssea (STERNLICHT; WERB, 2001; DONG et al., 2009; CHANG et al., 2013).

A literatura apoia evidências de que os SNPs desempenham papel importante na transcrição desses mediadores inflamatórios e influenciam o sucesso da osseointegração (DEREKA et al., 2012; COSYN et al., 2016; ALEKSANDROWICZ et al., 2017; LIN et al., 2018), incluindo SNPs em MMPs (SANTOS et al., 2004; LEITE et al., 2008; COSTA-JUNIOR et al., 2013). No entanto, muitos outros estudos não encontraram associação significativa entre perda de implantes dentais e SNPs (SANTOS et al., 2004; CAMPOS et al., 2005a, 2005b; MONTES et al., 2009; GUROL et al., 2011; PIGOSSI et al., 2014).

Um ponto importante para validar a associação entre SNPs e processos patológicos é um estudo com metodologia e desenho restrito (DEREKA et al., 2012; LIAO et al., 2014). Neste estudo, observamos um número de voluntários com poder estatístico estimado confiável e distribuição genotípica em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram incluídos fumantes, uma vez que o tabagismo é um forte fator de risco para falha precoce do implante (ESPOSITO et al., 1998) e poderia mascarar o efeito dos SNPs. Além disso, outros fatores de risco com idade, estado

periodontal, saúde sistêmica comprometida, posicionamento e número de implantes (LIN et al., 2018) foram excluídos ou pareados, tornando os resultados mais robustos e confiáveis. A análise do SNP MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) foi a única realizada com número menor de pacientes (137 voluntários, sendo 70 do grupo caso e 67 do grupo controle), devido à quantidade insuficiente de amostras para realizar a genotipagem. Contudo os resultados foram estatisticamente significativos.

Para a realização deste estudo de associação, foram padronizados protocolos. O método de extração de DNA utilizado foi adequado para obtenção de quantidades suficientes de DNA. As amplificações dos fragmentos por técnica de PCR tiveram suas condições otimizadas e a escolha da enzima de restrição para a técnica de RFLP foi adequada para a análise dos SNPs estudados. O ANEXO II mostra figura dos padrões de bandas encontrados em todos os SNPs estudados. Assim, com metodologia reprodutível, de baixo custo e pouco invasiva, foi possível identificar marcadores moleculares para pacientes de risco à perda precoce de implantes dentais osseointegrados.

Os resultados mostraram que SNPs isolados em diferentes genes de MMPs estão associados com a perda precoce do implante dental osseointegrados, sugerindo que a osseointegração depende do efeito cumulativo das interações de variantes de sequência no gene das MMPs com vias biológicas significativas. Esse estudo demonstrou associação entre os SNPs MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) e MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) e a perda precoce de implante; enquanto os SNPs MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) e MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) não foram associados isoladamente à perda de implante dentais. O ANEXO III apresenta as frequências alélicas e genotípicas de cada SNPs na população estudada.

Os resultados do SNP da MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) foram estatisticamente significativos, sugerindo que os genótipos C/C e C/T estão associados a perda precoce do implante e a presença alelo C confere um fator protetivo durante a osseointegração. Os dados desse estudo estão sendo utilizados na confecção de um artigo.

Na osseointegração, como acontece com qualquer processo complexo, a combinação de vários SNPs atuando sinergicamente pode aumentar o risco e a



susceptibilidade à falha. Além disso, é importante considerar que alguns SNPs podem ter seus efeitos mascarados por outros genes mais significativos, envolvidos com o tecido periodontal. Neste contexto, é essencial identificar a influência de cada alelo isoladamente e analisar a contribuição relativa de cada polimorfismo em combinação haplotípica. Nesse trabalho, a análise dos haplótipos dos SNPs MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750) e MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) sugere que o haplótipo T-A-GG-5A representa um fator de risco, enquanto os haplótipos C-A-G-6A e C-G-G-6A tem efeito protetor, indicando que estes SNPs são fatores de risco aditivos na osseointegração (ANEXO IV). Ainda, os resultados da regressão logística múltipla confirmaram que a presença de determinado alelo pode ter efeito de risco ou protetivo durante a osseointegração. Os resultados mostraram que os polimorfismos MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750) e MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395) têm um efeito de risco independente e sinérgico na perda de implantes(ANEXO V).

O estudo de SNPs em genes de MMPs associados à osseointegração mostrou-se promissor para descoberta de marcadores genéticos em pacientes de risco, o que pode contribuir na busca de estratégias para garantir um tratamento adequado e individualizado.

## 10. CONCLUSÃO

Em conclusão os resultados do presente estudo mostraram que a presença dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes das metaloproteinases (MMPs) isoladamente e em haplótipo influenciam na osseointegração de implantes dentais.

1. O SNP MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) isoladamente não representa um fator de risco para perda precoce de implante dental.
2. Os SNPs MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), e MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058) em haplótipo é fator de risco adicional para perda precoce do implante dental. O haplótipo T-A-GG-5A é fator de risco, enquanto os haplótipos C-A-G-6A e C-G-G-6A tem efeito protetor.
3. O SNP MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070) é fator de risco a perda precoce de implante dental, sendo que o alelo G confere um efeito protetor.
4. O SNP MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865) é fator de risco a perda precoce de implante dental, sendo que o alelo T confere um efeito protetor. Enquanto, o SNP MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) não representa um fator de risco para à perda precoce do implante dental.
5. O SNP MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) é um fator de risco a perda precoce do implante dental, sendo que o alelo C confere um efeito protetor.

## REFERÊNCIAS

- ABU EL-ASRAR, A.M.; MOHAMMAD, G.; ALLEGAERT, E.; et al. **Matrix metalloproteinase-14 is a biomarker of angiogenic activity in proliferative diabetic retinopathy.** Mol Vis., 18;24:394-406, 2018.
- AIDAR, M; LINE, S.R. **A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells.** Braz Dental J.,18:148-152, 2007.
- AGHA-HOSSEINI, F.; MIRZAI-DIZGAH, I.; MAHBOOBI N.; et al. **Serum and Saliva MMP-3 in Patients with OLP and oral SCC.** J Contemp Dent Pract., 1;16(2):107-11, 2015.
- AJMERA, D.H.; SINGH, P.; ZHU, Y.; et al. **A meta-analysis of MMP-9 promoter - 1562 C/T polymorphism on susceptibility of chronic periodontitis.** Springerplus. 26; 5:526, 2016.
- ALEKSANDROWICZ, P.; ZELECHOWSKA, P.; AGIER, J.; et al. **Evaluation of Metalloproteinase-8 Levels in Crevicular Fluid of Patients with Healthy Implants or Periodontitis** Mediators of Inflammation, 2017: doi: 10.1155/2017/4920847.
- ALVIM-PEREIRA, F.; MONTES, C.C.; MIRA, M.T.; et al. **Genetic susceptibility to dental implant failure: a critical review.** Int J Oral Maxillofac Implants, 23(3):409-16, 2008.
- AMERIO, P.; FREZZOLINI, A.; ABENI, D.; et al. **Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: relations with Th-1. Th-2. proinflammatory cytokines and disease activity. IL-18 is a marker of disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines.** Clin Exp Rheumatology, 20. 535-538, 2002.
- ANDRADE, A.L.; SANTOS, E.M.; CARMO, A.F.; et al. **Analysis of tryptase-positive mast cells and immunoexpression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions.** Int Endod J., 50(5):446-454, 2017. doi: 10.1111/iej.12638.
- ARAKAWA, H.; UEHARA, J.; HARA, E.S.; et al. **Matrix metalloproteinase-8 is the major potential collagenase in active peri-implantitis.** J Prosthodont Res., 56(4): 249-55, 2012.
- ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J.M.; BJORKHOLM, J.E.; et al. **Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles.** Opt Lett, 11: 288–290, 1986.
- ASTOLFI, C.M.; SHINOHARA, A, L.; DA SILVA, R.A.; et al. **Genetic polymorphism in the MMP-1 and MMP-3 gene may contribute to chronic periodontitis in a Brazilian population.** J Clin Periodontol., 33(10):699-703, 2006.
- BARBOLINA, M.V.; ADLEY, B.P.; ARIZTIA, E.V.; et al. **Microenvironmental regulation of membrane type I matrix metalloproteinase activity in ovarian**



**carcinoma cells via collagen induced EGR1 expression.** J Biol Chem., 282:4924–31, 2007.

BARLAS, I.O.; SEZGIN, M.; ERDAL, M.E.; et al. **Association of (-1,607) 1G/2G polymorphism of matrix metalloproteinase-1 gene with knee osteoarthritis in the Turkish population (knee osteoarthritis and MMPs gene polymorphisms).** Rheumatol Int., 29:383-388, 2009.

BHAKHAR, V.; BHAVSAR, N. **Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Oral Squamous Cell Carcinoma.** Scholars Journal of Applied Medical Sciences, 5(8C):3191-3197, 2017.

BHALLA, G.; ASTEKAR, M.S.; RAMESH, G.; et al. **Collagenase-3 expression in periapical lesions: an immunohistochemical study.** Biotech Histochem., 89(6): 457-63, 2014.

BARREIROS, D.; NELSON, P. F.; PAULA-SILVA, F.W.G.; et al. **MMP2 and MMP9 are associated with Apical Periodontitis Progression and Might be Modulated by TLR2 and MyD88.** Braz Dent J. 29(1):43-47, Jan/Feb. 2018, doi: 10.1590/0103-440201801731.

BASSET, P.; OKADA, A.; CHENARD, MP.; et al. **Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications.** Matrix Biol., 15: 535–541, 1997.

BRANEMARK, P.I.; ADELL, R.; BREINE, U.; et al. **Intra-osseous anchorage of dental prostheses I: experimental studies.** Scand J Plast Reconstr Surg., 3(2):81-100, 1969.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.; BODDEN, M.K.; et al. **Matrix metalloproteinases: a review.** Crit Rev Oral Biol Med, 4: 197-250, 1993.

BOLTON, C.E.; STONE, M.D.; EDWARDS, P.H.; et al. **Circulating matrix metalloproteinase-9 and osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Chron Respir Dis., 6(2):81-7, 2009.

BUSER, D.; SENNERBY, L.; DE BRUYN, H. **Modern implant dentistry based on osseointegration: 50 years of progress, current trends and open questions.** Periodontology 2000, 73(1):7-21, Feb. 2017.

BUTLER, G.S.; OVERALL, C.M. **Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new “intracellular” substrates revealed by degradomics.** Biochemistry, 48: 10830–10845, 2009.

CAMPOS, M.I.; GODOY DOS SANTOS, M.C.; TREVILATTO, P.C.; et al. **Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants.** Implant Dent., 14(4):391-6, 2005.

CAMPOS, M.I.; SANTOS, M.C.; TREVILATTO, P.C.; et al. **Evaluation of the relationship between interleukin-1 gene cluster polymorphisms and early**

**implant failure in non-smoking patients.** Clin Oral Implants Res., 16(2):194-201, 2005.

CARGILL, M.; ALSHULER, D.; IRELAND, J.; et al. **Characterization of single-nucleotide polymorphism in coding regions of human genes.** Nat Genet., 22: 231-238, 1999.

CASADO, P.L.; AGUIAR, D.P.; COSTA, L.C.; et al. **Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study.** BMC Oral Health, 11, 15:33, 2015.

CAUWE, B.; VAN DEN STEEN, P.E.; OPDENAKKER, G. **The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases.** Crit Rev Biochem Mol Biol., 42:11-85, 2007.

CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; et al. **Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.** Mol Cell Biochem., 253(1-2):269-85, 2003.

CHANG, Y.C.; YANG, S.F.; HSIEH, Y.S. **Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures.** Journal of Endodontics 27(11):679-82, 2001.

CHANG, C.; WERB, Z. **The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis.** Trends in Cell Biology 11:S37-S43, 2011.

CHANG, M.C.; CHAN, C.P.; WANG, W.T. **Toxicity of areca nut ingredients: Activation of CHK1/CHK2. induction of cell cycle arrest. and regulation of MMP-9 and TIMPs production in SAS epithelial cells.** Head Neck. 35. 1295–1302, 2013.

CLARK, R. **Wound repair: overview and general considerations.** In: Clark RAF. ed. **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair** (2nd ed.). New York: Plenum Press., 3-50, 1996.

CHEN, H.Y.; COX, S.W.; ELEY, B.M.; et al. **Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients.** J Clin Periodontol. 27(5):366-9, 2000.

CHEN, T.Y.; LI, Y.C.; LIU, Y. F.; et al. **Role of MMP14 gene polymorphisms in susceptibility and pathological development to hepatocellular carcinoma** Oncol. 18(8):2348-56, 2011.

CHEHAIBI, K.; HRIRA, M.Y.; NOUIRA, S.; et al. **Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the risk of ischemic stroke in a Tunisian population.** J Neurol Sci., 342(1-2):107-13, 2014.

CHOI, J.Y.; SIM, J.H.; YEO, I.L.; **Characteristics of contact and distance osteogenesis around modified implant surfaces in rabbit tibiae.** J Periodontal Implant Sci. 2017;47(3):182-192.

CHRCANOVIC, B.R.; ALBREKTSSON, T.; WENNERBERG, A. **Reasons for failures of oral implants.** J Oral Rehabil., 41(6):443-76, jun. 2014.

CORBEL, M.; BOICHOT, E.; LAGENTE, V. **Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury.** Braz J Med Biol Res. 33(7):749-54, Jul, 2000.

COSTA, P.P.; TREVISAN, G.L.; MACEDO, G.O. **Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes.** J Periodontol., 81: 384–391, 2010.

COSTA, G.C.; ARAS, M.; CHITRE, V. **Failure in dental implants.** Adv Dentl Med Sci., 2:68-81, 2014.

COSTA-JUNIOR, F.R.; ALVIM-PEREIRA, C.C.; ALVIM-PEREIRA, F.; et al. **Influence of MMP-8 promoter polymorphism in early osseointegrated implant failure.** Clin Oral Investig., 17(1):311-6, 2013.

COSYN, J.; CHRISTIAENS, V.; KONINGSVELD, V.; et al. **An Exploratory Case-Control Study on the Impact of IL-1 Gene Polymorphisms on Early Implant Failure.** Clin Implant Dent Relat Res., 18(2), 234-40, 2016.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Reparo dos tecidos: crescimento celular, fibrose e cicatrização de feridas. Patologia Estrutural e Funcional.** 6. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan S.A, 79-100, 1999.

DE ARAUJO MUNHOZ, F.B.; BRANCO, F.P.; SOUZA, R.L.R. ET AL. **Matrix metalloproteinases gene polymorphism haplotype is a risk factor to implant loss: A case-control study.** Clin Implant Dent Relat Res. 20(6):1003-1008, Dec. 2018. doi: 10.1111/cid.12671.

DE ARAUJO MUNHOZ FB, BRANCO FP, RODRIGUES SOUZA RL, DOS SANTOS MC. **MMP-13 POLYMORPHISM AS A RISK FACTOR IN IMPLANT LOSS.** Int J Oral Maxillofac Implants. Feb.2019 doi: 10.11607/jomi.7057.

DEAS, D.E.; MIKOTOWICZ, J.J.; MACKEY, S.A.; et al. **Implant failure with spontaneous rapid exfoliation: case reports.** Implant Dent, 11(3):235-42, 2002.

DELAISSÉ, J.M.; ENGSIG, M.T.; EVERTS, V.; et al. **Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles- Review.** Clin Chim Acta., 15;291 (2):223-34, 2000.

DEMIDOVA-RICE, T.N.; HAMBLIN, M.R.; HERMAN, I.M. **Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery. Part 1: normal and chronic wounds: biology. causes. and approaches to carie.** Adv Skin Wound Care. 25. 304-314, 2012.

DEREKA, X.; MARDAS, N.; CHIN, S.; et al. **A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications.** Clin Oral Implants Res., 23(7):775-788, 2012.



DIRSCHNABEL, A.J.; ALVIM-PEREIRA, F.; ALVIM-PEREIRA, C.C.; et al. **Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon.** Clin Oral Implants Res., 22:1235-1241, 2011.

DONG, W.; XIANG, J.; LI, C.; et al. **Increased expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer is associated with matrix metalloproteinase-1 and -2 in gingival tissues from patients with periodontitis.** J Periodontal Res., 4:125-132, 2009.

DOTTORE, A.M.; KAWAKAMI, P.Y.; BECHARA, K.; et al. **Stability of implants placed in augmented posterior mandible after alveolar osteotomy using resorbable nonceramic hydroxyapatite or intraoral autogenous bone: 12-month follow-up.** Clinical Implant Dentistry and Related Research, 16: 330–336, 2014.

DUTOV, P.; ANTIPOVA, O.; VARMA, S.; et al. **Measurement of Elastic Modulus of Collagen Type I Single Fiber.** PLoS One, 22;11(1), 2016.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. **New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.** Nat. Rev, Cancer, 2:161–174, 2002.

EKFELDT, A.; CHRISTIANSSON, U.; ERIKSSON, T.; et al. **A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae.** Clin Oral Implants Res, 12(5):462-7, 2001.

ESCALONA, L.A.; MASTROMATTEO-ALBERGA, P.; CORRENTI, M. **Cytokine and metalloproteinases in gingival fluid from patients with chronic periodontitis.** Invest Clin., 57(2):131-142, 2016.

ESPOSITO, M.; HIRSCH, J.M.; LEKHOLM, U.; et al. **Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis.** Eur J Oral Sci., 106: 721-764, 1998.

EVROSIMOVSKA, B.; DIMOVA, C.; KOVACEVSKA, I.; et al. **Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue.** Prilozi., 33(2):191-204, 2012.

FREIJE, J.M.; BALBÍN, M.; PENDÁS, A.M.; et al. **Matrix metalloproteinases and tumor progression.** Adv Exp Med Biol., 532:91-107, 2003.

FRIBERG, B.; JEMT, T.; LEKHOLM, U. **Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses.** Int J Oral Maxillofac Implants, 6: 142-146, 1991.

FURUYA, M.; ISHIKURA, H.; NEMORI, R.; et al. **Clarification of the active gelatinolytic sites in human ovarian neoplasms using in situ zymography.** Human Pathol., 32: 163–8, 2001.

GEHRKE, S.A.; VIANNA, M.S.; DEDAVID, B.A. **Influence of bone insertion level of the implant on the fracture strength of different connection designs: an in vitro study.** Clinical Oral Investigations, v. 18, n. 3, p. 715–720, 2014.

GHIGHI, M.; LORENS, A.; BAROUKH, B.; et al. **Differences between inflammatory and catabolic mediators of peri-implantitis and periodontitis lesions following initial mechanical therapy: An exploratory study.** J Periodontal Res., 53(1):29-39, 2018.

GORMAN, J.L.; ISPANOVIC, E.; HAAS, L. **Regulation of matrix metalloproteinase expression.** Drug Discovery Today: Disease Models. 8(1):5–11, 2011.

GROBLEWSKA, M.; SIEWKO, M.; MROCZKO, B.; et al. **The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer.** Folia Histochem Cytobiol. 24;50(1):12-9, 2012.

GREENSTEIN, G.; HART, T.C. **Clinical utility of a genetic susceptibility test for severe chronic periodontitis: a critical evaluation.** J Am Dent Assoc., 133:452-459, 2002.

GUROL, C.; KAZAZOGLU, E.; DABAKOGLU, B.; et al. **A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis.** Int J Oral Maxillofac Implants. 26(5):955-60, 2011.

GURSOY, U.K.; KÖNÖNEN, E.; HUUMONEN, S.; et al. **Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis.** J Clin Periodontol. 40(1):18-25, 2013.

GURSOY, U.K.; KÖNÖNEN, E.; TERVAHARTIALA, T.; et al. **Molecular forms and fragments of salivary MMP-8 in relation to periodontitis.** J Clin Periodontol., Oct. 2018. doi: 10.1111/jcpe.13024.

HADLER-OLSEN, E.; FADNES, B.; SYLTE, I.; et al. **Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease.** FEBSJ, 278(1):28-45, 2011.

HADZIABDIC, N.; KURTOVIC-KOZARIC, A.; POJSKIC, N. **Gene-expression analysis of matrix metalloproteinases 1 and 2 and their tissue inhibitors in chronic periapical inflammatory lesions.** J Oral Pathol Med., 45(3):224-30, 2016.

HASAN M.M. **Review on dental implants: Success and failure.** Bangladesh J Dent Res Educ., 2:22-3, 2012.

HE, X.; ZHANG, L.; YAO, X.; et al. **Association studies of MMP-9 in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis.** PLoS One, 8(9):e73777, 2013.

HEIKKINEN, A.M.; KETTUNEN, K.; KOVANEN, L.; et al. **Inflammatory mediator polymorphisms associate with initial periodontitis in adolescents.** Clin Exp Dent Res., 30;2(3):208-215, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; EL-HAJAHMAD, M.; MASSARO, J.; et al. **Expression of gelatinases (MMP-2,MMP-9) and gelatinase activator (MMP-14) in actinic keratosis and in in situ and invasive squamous cell carcinoma.** Am. J. Dermatopathol., 7. 723–728, 2012.

HERNÁNDEZ-RÍOS, M.; HERNÁNDEZ, M.; GARRIDO M. **“Oral fluid matrix metalloproteinase (MMP)-8 as a diagnostic tool in chronic periodontitis.** Metalloproteinases in Medicine, 3:11-18, 2016.

HERSZÉNYI, L.; HRITZ, I.; LAKATOS, G.; et al. **The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer.- Review.** Int J Mol Sci., 16;13(10):13240-63, 2012.

HOLM-PEDERSEN, P.; LANG, N.P.; MULLER, F. **What are the longevities of teeth and oral implants?** Clin Oral Implants, n. 18, p.15-19, 2007.

HU, Y.; LIANG. D.; LI. X.; et al. **The role of interleukin-1 in wound biology. Part II: In vivo and human translational studies.** Anesth Analg., 111. 1534-1542, 2010.

HUNTLEY, G.W. **Synaptic circuit remodeling by matrix metalloproteinases in health and disease.** Nature Reviews, 13: 743-757, 2012.

HUTTON, J.E.; HEATH, M.R.; CHAI, J.Y. et al. **Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Brånemark implants.** Int J Oral Maxillofac Implants, 10(1):33-42, 1995.

INGMAN, T.; SORSA, T.; LINDY, O.; et al. **Multiple forms of gelatinases/type IV collagenases in saliva and gingival crevicular fluid of periodontitis patients.** Journal of Clinical Periodontology, 21(1). 26–31, 1994.

INSUA, A.; MONJE, A.; WANG, H.L.; et al. **Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss.** J Biomed Mater Research Part A,105(7): 2075-2089, 2017.

ITOH, Y.; SEIKI, M. **MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment.** J Cell Physiol., 1, 1–8, 2006.

JOHNSEN, M.; LUND, L.R.; ROMER, J.; et al. **Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation.** Curr Opin Cell Biol,10: 667–671, 1998.

KANG, C.M.; LEE, J.H.; JEON, M.; et al. **The Effect of MMP-13, MMP-12, and AMBN on Gingival Enlargement and Root Deformation In a New Type of Gingival Fibromatosis.** J Clin Pediatr Dent., 42(1):50-54. 2018. doi: 10.17796/1053-4628-42.1.9.

KARAYASHEVA, D.; GLUSHKOVA, M.; BOTEVA, E.; et al. **Association study for the role of Matrix metalloproteinases 2 and 3 gene polymorphisms in dental caries susceptibility.** Arch Oral Biol., 68:9-12. 2016.



KASURINEN, A.; TERVAHARTIALA, T.; LAITINEN, A.; et al. **High serum MMP-14 predicts worse survival in gastric cancer.** PLoS One, 7;13(12):e0208800, Dec. 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0208800

KATE, M.A.; PALASKAR, S.; KAPOOR, P. **Implant failure: A dentist's nightmare.** J Dent Implant, 6:51-6, 2016.

KIVELÄ-RAJAMÄKI, M.; MAISI, P.; SRINIVAS R. **Levels and molecular forms of MMP-7 (matrilysin-1) and MMP-8 (collagenase-2) in diseased human peri-implant sulcular fluid.** J Periodontal Research, 38(6): 583-90, 2003.

KNAUPER, V.; OSTHUES, A.; DECLERCK, Y.A.; et al. **Fragmentation of human polymorphonuclear-leucocyte collagenase.** Biochem J., 291; 847-854, 1993.

KNÄUPER, V.; BAILEY, L.; WORLEY, J.R.; et al. **Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13.** FEBS Lett., 4;532(1-2):127-30, Dec. 2002.

KONOPKA, L.; PIETRZAK, A.; BRZEZIŃSKA-BŁASZCZYK, E. **Effect of scaling and root planing on interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8 and MMP-8 levels in gingival crevicular fluid from chronic periodontitis patients.** J Periodontal Res., 47(6):681-8, 2012.

LAHDENTAUSTA, L.S.J.; PAJU, S.; MÄNTYLÄ, P.; et al. **Saliva and serum biomarkers in periodontitis and coronary artery disease.** J Clin. Periodontol., 45(9):1045-1055, Sep. 2018. doi: 10.1111/jcpe.12976.

LEE, J.H.; LEE, J.B.; KIM, M.Y., et al. **Mechanical and biological complication rates of the modified lateral-screw-retained implant prosthesis in the posterior region: an alternative to the conventional implant prosthetic system.** J Adv Prosthodont. 8(2): 150-157, 2016.

LEE, B.A.; KIM, B.H.; KWEON, H.H.I.; et al. **The prosthetic abutment height can affect marginal bone loss around dental implants.** Clin Implant Dent Relat Res., 26 Jul. 2018. doi: 10.1111/cid.12648.

LENGLET, S.; MONTECUCCO, F.; MACH, F. **Role of matrix metalloproteinases in animal models of ischemic stroke.** Current Vasc.Pharmacol., 13(2):161-6, 2015.

LEITE, M.F.F.; SANTOS, M.C.L.G.; SOUZA, A.P.; et al. **Osseintegrated implant failure associated with MMP-1 promoter polymorphisms (-1607 and -519).** Int J Oral Maxillofac Implants, 23: 653-658, 2008.

LI, G.; YUE, Y.; TIAN, Y.; et al. **Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population.** Cytokine, 60(2):552-60, 2012 .

LI, J.; YIN, X.; HUANG, L.; et al. **Relationships among Bone Quality Implant Osseointegration and Wnt Signaling.** J Dent Res., 96(7):822-831, 2017.

LI, L.; LIU, J.; QIN, S.; LI R. **The association of polymorphisms in promoter region of MMP2 and MMP9 with recurrent spontaneous abortion risk in Chinese population.** *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(40):e12561.

LI Y.; WANG Y.; SUN H et al. **Association Between Matrix Metalloproteinase-1, 2, 3 Polymorphisms and Oral Cancer Risk: A Meta-Analysis.** *Genet Test Mol Biomarkers*. 22(8):456-464, 2018. doi: 10.1089/gtmb.2018.0089.

LIAO, J.; LI, C.; WANG, Y., et al. **Meta-analysis of the association between common interleukin-1 polymorphisms and dental implant failure.** *Mol Biol Rep.*, 41(5):2789-2798, 2014.

LIN, G.; YE, S.; LIU, F.; et al. **A retrospective study of 30,959 implants: risk factors associated with early and late implant loss.** *J Clin Periodontol.*, 45:733-743, 2018.

LUIZON, M.R.; DE ALMEIDA BELO, V. **Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 polymorphisms and haplotypes as disease biomarkers.** *Biomarkers*. 2012;17(3):286-8.

LIU, L.; LI, C.; CAI, X.; et al. **The temporal expression and localization of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) during the development of periodontitis in an animal model.** *J Periodontal Res.*, 2010; 45. 541-549.

LIU, J.W.; CHEN, D.Q. **Correlations of MMP-2 and MMP-9 gene polymorphisms with the risk of hepatopulmonary syndrome in cirrhotic patients: A case-control study.** *Kaohsiung J Med Sci*. 2018; 34(11):634-642.

LIUTKEVIČIENĖ, R.; VILKEVIČIŪTĖ, A.; BANEVIČUS, M.; MIEŽYTĖ, R.; KRIAUCIŪNIENĖ, L. **Association of MMP-2 (-1306 C/T) Gene Polymorphism with Predisposition to Optic Neuritis and Optic Neuritis Together with Multiple Sclerosis.** *Medicina (Kaunas)*. 2018; 54(2).

LOGAR, D.B.; KOMADINA, R.; PREZELJ, J.; et al. **Expression of bone resorption genes in osteoarthritis and in osteoporosis.** *J Bone Miner Metab.*, 25(4):219-25, 2007.

LOMBARDI, F.; BELLETTI, S.; BATTEZZATI, P.M.; et al. **MMP-1 and MMP-3 polymorphism and arrhythmia recurrence after electrical cardioversion in patients with persistent atrial fibrillation.** *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 12(1):37-42, 2011.

LUO, S.; DENG, M.; LONG, X.; et al. **Association between polymorphism of MMP-1 promoter and the susceptibility to anterior disc displacement and temporomandibular joint osteoarthritis.** *Arch Oral Biol.*, 60(11):1675-80, 2015.

MACIEJCZYK, M.; PIETRZYKOWSKA, A.; ZALEWSKA, A.; et al. **The Significance of Matrix Metalloproteinases in Oral Diseases.** *Adv Clin Exp Med.*, 25(2):383-90. 2016.

- MADISCH, A.; HELLMIG, S.; SCHREIBER, S.; et al. **Allelic variation of the matrix metalloproteinase-9 gene is associated with collagenous colitis**. *Inflamm Bowel Dis.*, 11:2295-8, 2011.
- MARCACCINI, A.M.; MESCHIARI, C.A.; ZUARDI, L.R.; et al. **Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy**. *J Clin Periodontol.*, 37(2):180-90, 2010.
- MAY, MC.; ANDREWS, P.N.; DAHER, S.; et al. **Prospective cohort study of dental implant success rate in patients with AIDS**. *Int J Implant Dent.*, 2(1):20, 2016.
- MATRISIAN, L.M. **The matrix-degrading metalloproteinases**. *Bioessays*, 14(7): 455-463, 1992.
- MCGEEHAN, G.; BURKHART, W.; ANDEREGG, R.; et al. **Sequencing and characterization of the soybean leaf metalloproteinase: structural and functional similarity to the matrix metalloproteinase family**. *Plant Physiol.*, 99:1179–1183, 1992.
- MENEZES-SILVA, R.; KHALIQ, S.; DEELEY, K; et al. **Susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response**. *J Endod.*, 38(5):604-7. 2012.
- MONTES, C.C.; ALVIM-PEREIRA, F.; DE CASTILHOS, B.B.; et al. **Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population**. *Clin Oral Implants Res.*, 20: 208-217, 2009.
- MOTT, D.J.; WERB, Z. **Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases**. *Current Opinion in Cell Biology*, 16:558–564, 2004.
- MOUHYI, J.; DOHAN EHRENFEST, D.M.; ALBREKTSSON, T. **The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects**. *Clin Implant Dent Relat Res.*, 75: 145-156, 2009.
- MOURANT, A.E.; GODBER, M.J.; KOPEĆ, A.C.; et al. **Genetical studies at high and low altitudes in Ethiopia**. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, 27;194(1114):17-22, 1976.
- MUNHOZ, F.B.A. **associação entre polimorfismo na MMP-13 (isolado e em haplótipo com MMP-1 e MMP-8) e Tendinopatia primária do tibial posterior**. Curitiba, p.18. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2014.
- MUNHOZ, F.B.A.; NOGARA, P.R.B.; COSTA-JUNIOR, F.R.; **Analysis of MMP-3 polymorphism in osseointegrated implant failure**. *Braz J Oral Sci.*, 15:4, 2016.



NAGASUPRIYA, A.; RAO, D.B.; RAVIKANTH, M.; et al. **Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase 13 in chronic periodontitis**. Int J Periodontics Restorative Dent., 34(4):e79-84, 2014.

NALLASWAMY, D.V.; RAMALINGAM, K.; BHAT, V. **Implant dentistry**. In: **Textbook of Prosthodontics**. 1st ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publications, p. 736-38, 2003.

NASCIMENTO, G.G.; BAEUM, V.; SORSA, T. **Salivary levels of MPO, MMP-8 and TIMP-1 are associated with gingival inflammation response patterns during experimental gingivitis**. Cytokine, Jan. 2019. doi: 10.1016/j.cyt.2018.12.002.

NEWBY, A.C. **Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture**. Physiol Rev, 85:1–31, 2005.

NEGM, S.A.M. **Implant Success versus Implant Survival**. Dentistry 6:359, 2016.

NIE, S.W.; WANG, X.F.; TANG, Z.C. **Correlations between MMP-2/MMP-9 promoter polymorphisms and ischemic stroke**. Int J Clin Exp Med., 15;7(2):400-4 2014.

NISHIDA, Y.; MIYAMORI, H.; THOMPSON, E.W.; et al. **Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2**. Cancer Res., 1;68(21):9096-104, 2008.

NISHIOKA, Y.; KOBAYASHI K.; SAGAE, S.; et al. **A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter in endometrial carcinomas**. Jpn J Cancer Res. 91(6):612-615, 2000.

NISSINEN, L.; KAHARI, V.M. **Matrix metalloproteinases in inflammation**. Biochem Biophys Acta., 1840. 2571-2580, 2014.

NORTON, M.R. **Multiple single-tooth implant restorations in the posterior jaws: maintenance of marginal bone levels with reference to the implant-abutment microgap**. Int J Oral Maxillofac Implants, 21(5): 777-784, 2006.

NOSRATZEHI, T.; ALIJANI, E.; MOODI, M. **Salivary MMP-1, MMP-2, MMP-3 and MMP-13 Levels in Patients with Oral Lichen Planus and Squamous Cell Carcinoma**. Asian Pac J Cancer Prev., 27;18(7):1947-1951, 2017.

OHNISHI, K.; TAKAGI, M.; KUROKAWA, Y.; et al. **Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema**. Lab Invest., 78:1077–87, 1998.

OKADA, Y.; NAKA, K.; KAWAMURA, K.; et al. **Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption**. Lab Invest, 72: 311-322, 1995.

ORGEL, J.P.R.O.; PERSIKOV, A.V.; ANTIPOVA, O. **Variation in the helical structure of native collagen**. PLoS One, 2014.

PAIVA KB, GRANJEIRO JM. **Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions**. Arch Biochem Biophys.;561:74-87, 2014.

PAN, Y.; LI, D.; CAI, Q.; et al. **MMP-9 -1562C>T contributes to periodontitis susceptibility**. J Clin Periodontol., 40(2):125-30, 2013.

PAQUETTE, D.W.; BRODALA, N.; WILLIAMS, R.C. **Risk factors for endosseous dental implant failure**. Dent Clin N Am, 50(3):361-74, 2006.

PARK, K.S.; KIM, S.J.; KIM, K.H.; et al. **Clinical characteristics of TIMP2, MMP2, and MMP9 gene polymorphisms in colorectal cancer**. J Gastroenterol Hepatol, 26(2): 391-397, 2011.

PATRUNO, A.; FERRONE, A.; COSTANTINI, E.; et al. **Extremely low-frequency electromagnetic fields accelerates wound healing modulating MMP-9 and inflammatory cytokines**. Cell Prolif., Jan. 2018. doi: 10.1111/cpr.12432.

PEREIRA, A.C.; DIAS DO CARMO, E.; DIAS DA SILVA, M.A; et al. **Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and oral câncer**. J Clin Exp Dent, 4(5):e297-301, 2012.

PESCE, M.; PATRUNO. A.; SPERANZA. L.; et al. **Extremely low frequency electromagnetic field and wound healing: implication of cytokines as biological mediators**. Eur Cytokine Network. 24. 1-10, 2013.

PETKOVIC-CURCIN, A.; ZELJIC, K.; CIKOTA-ALEKSIC, B.; et al. **Association of Cytokine Gene Polymorphism with Peri-implantitis Risk**. Int J Oral Maxillofac Implants, 32(5), e241-e248, 2017.

PIGOSSI, S.C.; ALVIM-PEREIRA, F.; ALVIM-PEREIRA, C.C.; et al. **Association of interleukin-4 gene polymorphisms with dental implant loss**. Implant Dent., 23(6), 723-31, 2014.

PINTO, A.V.S.; MIYAGUSKO, J.M.; RAMALHO, A.S.; WASSALL, T.; PEREIRA, L.A. **Fatores de risco, complicações e fracassos na terapêutica com implantes osseointegrados**. In. *Atualização na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas: p.132-216, 2000.

PRIVALOVA, E.V.; KAPLUNOVA, V.Y.; KOZHEVNIKOVA, M.V.; et al. **Matrix metalloproteinases and hypertrophic cardiomyopathy**. J Neurol Sci., 54(5):4-7, 2014.

QI, Y.; WANG, J.; SUN, M.; et al. **MMP-14 single-nucleotide polymorphisms are related to steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in the population of northern China**. Mol Genet Genomic Med., 2018 Dec 12. doi: 10.1002/mgg3.519.

RA, H.J.; PARK, S.W.C. **Control of matrix metalloproteinase catalytic activity.** Matrix Biol., 26: 587–596, 2007.

RAI, B.; KHARB, S.; JAIN, R.; et al. **Biomarkers of periodontitis in oral fluids.** J Oral Sci., 50(1):53-6, 2008.

RAMOS-FERNANDEZ, M.; BELLOLIO, M.F.; STEAD, L.G. **Matrix metalloproteinase- 9 as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review.** J Stroke Cerebrovasc Dis., 20(1):47-54, 2011.

RIVERA, S.; KHRESTCHATISKY, M.; KACZMAREK, L.; et al. **Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?.** J. Neurosci., 30:15337–15357, 2010.

SAEED, H.M.; ALANAZI, M.S.; ALSHAHRANI, O.; et al. **Matrix metalloproteinase-2 C(-1306)T promoter polymorphism and breast cancer risk in the Saudi population.** Acta Biochim Pol., 60(3):405-9, 2013.

SAEED, H.M.; ALANAZI, M.S.; PARINE, N.R.; et al. **Matrix metalloproteinase-2 (-1306 C>T) promoter polymorphism and risk of colorectal cancer in the Saudi population.** Asian Pac J Cancer Prev, 14(10):6025-30, 2013.

SAMNEGÅRD, A.; SILVEIRA, A.; LUNDMAN, P. et al. **Serum matrix metalloproteinase-3 concentration is influenced by MMP-3 -1612 5A/6A promoter genotype and associated with myocardial infarction.** J Intern Med., 258(5):411-9, 2005.

SAMPAIO FERNANDES, M.; VAZ, P.; BRAGA, A.C.; et al. **The role of IL-1 gene polymorphisms (IL1A, IL1B, and IL1RN) as a risk factor in unsuccessful implants retaining overdentures.** J Prosthodont Res., S1883-1958(17)30013-0, 2017.

SANTOS, M.C.; CAMPOS, M.I.; SOUZA, A.P.; et al. **Analysis of MMP-1 and MMP-9 promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure.** Int J Oral Maxillofac Implants, 19(1):38-43, 2004.

SAKKA, S.; COULTHARD P. **“Implant failure: etiology and complications.”** Medicina Oral. Patologia Oral y Cirurgia Bucal, vol. 16, p. e42–e44, 2011.

SATTARI, MAHSHID.; HASSANZAD, M.; JAMALDINI, S.H. **Association between matrix metalloproteinases 2-1306C/T polymorphism and the risk of coronary artery disease in Iranian population.** Pathophysiology, 24(3):185-189. doi: 10.1016/j.pathophys.2017.

SCHVEIGERT, D.; VALUCKAS, K.P.; KOVALCIS, V.; et al. **Significance of MMP-9 expression and MMP9 polymorphism in prostate cancer.** Tumori, 99(4):523-9, 2013.



ŞENTÜRK, R.A.; SEZGIN, Y.; BULUT, Ş.; et al. **The effects of smoking on the expression of gelatinases in chronic periodontitis: a cross-sectional study.** Braz Oral Res., 25;32: 114, Oct. 2018. doi: 10.1590/1807-3107

SEYMOUR, G.J.; GEMMELL, E.; LENZ L.J.; et al. **Immunohistologic analysis of the inflammatory infiltrates associated with osseointegrated implants.** Int J Oral Maxillofac Implants, 4(3):191-198, 1989.

SHALABY, M.A.; NOUNOU, H.A.; AZZAM, N.; et al. **Associations between single nucleotide polymorphisms of COX-2 and MMP-2 genes and colorectal cancer susceptibility in the Saudi population.** Asian Pac J Cancer Prev, 15:4989-94, 2014.

SHALIA, K.K.; SHAH, V.K.; MASHRU, M.R.; et al. **Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) -1612 5A/6A promoter polymorphism in coronary artery disease in Indian population.** Indian J Clin Biochem., 25(2):133-40, 2010.

SHAPIRO, S.D. **Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences.** Curr Opin Cell Biol, 10: 602–608, 1998.

SHINKARENKO, T. V.; RUMIANTSEV, V. A.; EGOROVA, E. N. **Matrix metalloproteinases in periodontitis.** Stomatologiya (Mosk). 92. 77–80, 2013.

SINGH, R.D.; PATEL, J.B.; SHAH, F.D.; et al. **Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors: Correlation with Invasion and Metastasis in Oral Cancer.** Ind J Clin Biochem., 25(3):250–259, 2010.

SINGH, K.; AGRAWAL, N.K.; GUPTA, S.K. **A functional single nucleotide polymorphism -1562 C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers.** Int J Low Extrem Wounds, 12(3):199-204, 2013.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. **Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases.** Oral Dis., 10, 311-8, 2004.

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; KONTTINEN, Y.T.; et al. **Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation.** Ann Med., 38:306-321, 2006.

SOUZA, K.P. **Caracterização bioquímica de metaloproteínas de parasitas tripanosomatídeos.** Portugal, p7. Dissertação (Mestrado em Ciências biomédicas) Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, 2013.

SPINALE, F.G. **Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function.** Physiol Ver., 87(4):1285-342, 2007.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. **How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.** Annu, Rev, Cell Dev, Biol, 17: 463–516, 2001.

SUN, R.; HUANG, Y.; ZHANG, H.; et al. **MMP-2, TNF- $\alpha$  and NLRP1 polymorphisms in Chinese patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis.** Mol Biol Rep., 40(11):6303-8, 2013.

ŞURLIN, P.; OPREA, B.; SOLOMON, S.M.; et al. **Matrix metalloproteinase -7, -8, -9 and -13 in gingival tissue of patients with type 1 diabetes and periodontitis.** Rom J Morphol Embryol., 55(3 Suppl):1137-41, 2014.

TAMIMI, D. F. **Especialidades em imagens implantas.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

TAMURA, R.N.; ODA, D.; QUARANTA, V.; et al. **Coating of titanium alloy with soluble laminin-5 promotes cell attachment and hemidesmosome assembly in gingival epithelial cells: potential application to dental implants.** J Periodontal Res., Apr;32(3):287-94, 1997.

THIERBACH, R.; MAIER, K.; SORSA, T.; et al. **Peri-Implant Sulcus Fluid (PISF) Matrix Metalloproteinase (MMP)-8 Levels in Peri-Implantitis.** J Clin Diagn Res., 10(5): ZC34-8, 2016.

THOMPSON, M.W.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F.; et al. **Genetics in Medicine.** 5.ed, Pensilvania: Philadelphia, p 500, 1991.

TOTH, M.; CHVYRKOVA, I.; BERNARDO, M.M.; et al. **Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes.** Biochem Biophys Res Commun., 22;308(2):386-95, 2003.

TRAINI, T.; NOVAES, A.B.; PIATTELLI, A.; et al. **The relationship between interimplant distances and vascularization of the interimplant bone.** Clin Oral Implants Res. 21(8):822-829, 2010.

TREVILATTO, P.C.; LINE, S.R. **Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments.** J Forensic Odontostomatol., 18(1):6-9, 2000.

TROMBONE, A.P.; CAVALLA, F.; SILVEIRA, E.M.; et al. **MMP-1 -1607 polymorphism increases the risk for periapical lesion development through the upregulation MMP-1 expression in association with pro-inflammatory milieu elements.** J Appl Oral Sci., 24(4):366-75, 2016.

TSAI, C.W.; HSU, H.M.; WANG, Y.C.; et al. **Contribution of MMP2 Promoter Genotypes to Oral Cancer Susceptibility, Recurrence and Metastasis in Taiwan.** Anticancer Res., 38(12):6821-6826, Dec. 2018, doi: 10.21873/anticanres.13055.

VAFADARI, B.; SALAMIAN, A.; KACZMAREK, L. **MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy.** J Neurochem., 2:91-114, 2016.

VAIRAKTARIS, E.; YAPIJAKIS, C.; VASILIOU, S.; et al. **Association of -1171 promoter polymorphism of matrix metalloproteinase-3 with increased risk for oral cancer.** *Anticancer Res.*, 27(6B):4095-100, 2007.

VELEGOL, D; LANNI, F. **Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels.** *Biophys J*, 81: 1786–1792, 2001.

WANG, H.; GUAN, X.; LUO, Z.; et al. **The association and potentially destructive role of th9/IL-9 is synergistic with th17 cells by elevating MMP9 production in local lesions of oral lichen planus.** *J. Oral Pathol Med.* 47(4):425-433, Apr. 2018. doi: 10.1111/jop. 12690.

WAKABAYASHI, R.C.; IHA, D.K.; NIU, J.J.; et al. **Cytokine production by cells adherent to regenerative membranes.** *J Periodontal Res.*, 32(2):215-24, Feb. 1997.

WENG, C.J.; YEN, G.C. **The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of Ganoderma lucidum on cancer invasion and metastasis.** *Clin Exp Metastasis*, 27:361–9, 2010.

WENG, C.J.; CHEN, M.K.; LIN, C.W.; et al. **Single nucleotide polymorphisms and haplotypes of MMP-14 are associated with the risk and pathological development of oral cancer.** *Ann Surg Oncol.*, 3:S319-27, Jul. 2012.

WOESSNER, Jr.J.F. **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.** *FASEB J*, 8: 2145- 2154, 1991.

WOESSNER, F.; NAGASE, H. **Matrix Metalloproteinases and TIMPs.** Oxford Univ. Press. Oxford, UK, 2000.

WU, S.; LU, S.; TAO, H.; et al. **Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer.** *J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci*, 31(1): 114-119, 2011.

WU, H.D.; BAI, X.; CHEN, D.M.; et al. **Association of genetic polymorphisms in matrix metalloproteinase-9 and coronary artery disease in the Chinese Han population: a case-control study.** *Genet Test Mol Biomarkers*, 17(9):707-12, 2013.

YANG, D.; WANG, J.; NI, J.; et al. **Temporal expression of metalloproteinase-8 and -13 and their relationships with extracellular matrix metalloproteinase inducer in the development of ligature-induced periodontitis in rats.** *J Periodontal Res.* 48,411-419, 2013.

YE, S. **Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases,** *Matrix Biol*, 19: 623–639, 2000.

YE, S.; PATODI, N.; WALKER-BONE, K.; et al. **Variation in the matrix metalloproteinase -3, -7, -12 and -13 genes is associated with functional status in rheumatoid arthritis.** *Int J Immunogenet.*, 34 (2):81–85, 2007.



YESHWANTE, B.; PATIL, S.; BAIG, N.; et al. **Dental implants-classification, success and failure-overreview article**. IOSR J f Dent Med Sci., 14:1-8, 2015.

ZHANG, H.; ADWANIKAR, H.; WERB, Z.; et al. **Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes**. Neuroscientist, 16, 156–170, 2010.

ZELTZ, C.; ORGEL, J.; GULLBERG, D. **Molecular composition and function of integrin-based collagen glues-Introducing COLINBRIs**. Biochim Biophys Acta. 1840(8):2533-48, 2014.

ZHOU, X.; GAO, Y.; JOHNSON, N.W.; et al. **Immuno expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue**. Australian Dental Journal, 55: 385-389, 2010.

**ANEXO I - PARECER CONSUBSTANCIADO DE APROVAÇÃO, EMITIDO PELO COMITÊ  
DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP/SD), DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS E DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE OSSEointegração DE IMPLANTES DENTAIS.

**Pesquisador:** Maria Cristina Leme Godoy dos Santos

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 54921616.0.0000.0102

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.259.183

**Apresentação do Projeto:**

Titulo do projeto: Influência de polimorfismos e do padrão de metilação do DNA de genes envolvidos no processo de osseointegração de implantes dentais. Tem como pesquisadora principal a Profa Dra Maria Cristina Leme Godoy dos Santos e como pesquisadores colaboradores Prof. Dr. Ricardo Lehtonen de Souza e Profa Dra Ana Paula de Souza e a aluna de pós-graduação Francielle Boçon de Araujo Munhoz.

Os implantes dentários osseointegrados revolucionaram a implantologia e são amplamente utilizados para substituir dentes ausentes, aliando funcionalidade e estética, sendo a alternativa mais comum para diversas situações de edentulismo. Apesar de a osseointegração apresentar resultados previsíveis e reproduzíveis garantindo um alto índice de sucesso no tratamento, falhas como a perda do implante ainda ocorrem e o aumento do uso desse procedimento ao longo dos últimos anos torna o problema cada vez mais frequente, por vezes, sem causa clinicamente definida. Sabe-se que a osseointegração é um processo multifatorial dependente do chamado "fenótipo clínico", que pode incluir condição de saúde sistêmica do indivíduo, modificações genéticas como polimorfismos

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

**Bairro:** Alto da Glória

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.259.183

(SNPs) e alterações epigenéticas no padrão de metilação do DNA do paciente. Além disso, o hábito de fumar cigarros, compromete a integridade do material genético das células da mucosa bucal e de seus mediadores químicos e enzimáticos e é um fator de risco a osseointegração. Dessa forma, parece importante analisar o papel de polimorfismos genéticos isolados e em haplótipos, assim como, o padrão de metilação de DNA na falha da osseointegração de pacientes fumantes e não

fumantes, uma vez que, o conhecimento da etiologia e de fatores associados à falha de implante pode ajudar no reconhecimento desses pacientes e auxiliar o desenvolvimento de um tratamento adequado em conjunto com estratégias de prevenção.

A obtenção do material será realizada mediante consentimento do grupo amostral, após breve explanação dos objetivos do estudo. Em consulta ao cirurgião-dentista o indivíduo será informado por ele e através de cartaz sobre a pesquisa e o voluntariado para sua participação. O indivíduo que se dispuser a participar será instruído a encaminhar e-mail à pesquisadora responsável, quando necessário poderão solicitar a secretaria do consultório odontológico auxílio para envio do e-mail.

A amostra, será composta por indivíduos saudáveis, brasileiros de ambos os sexos, adultos (acima de 25 anos), fumantes (5 cigarros ou mais/dia há pelo menos 5 anos) e não-fumantes (indivíduos que declararam nunca fumaram). Estes indivíduos serão recrutados de clínicas odontológicas com taxas de insucesso para o tratamento com implantes menores que 5%, condizendo com o aceito pela literatura. Após triagem inicial, os indivíduos serão divididos em: Grupo 1: Voluntários não-fumantes e que obtiveram sucesso no tratamento com implantes dentários osseointegrados, estando os implantes em carga funcional a pelo menos 6 meses, sem mobilidade ou sintomatologia; Grupo 2: Voluntários fumantes, que obtiveram sucesso no tratamento com implantes dentários osseointegrados, estando os implantes em carga funcional a pelo menos 6 meses, sem mobilidade ou sintomatologia; Grupo 3: Voluntários não-fumantes e que sofreram perda de implantes dentários osseointegrados; Grupo 4: Voluntários fumantes e que sofreram perda de implantes dentários osseointegrados. Para genotipagem dos polimorfismos será realizada a técnica de PCRRFLP, utilizando 100 amostra dos Grupos 1 e 3. Voluntários fumantes (Grupos 2 e 4) não serão incluídos nessa análise para que o fator fumo não mascare a influencia dos polimorfismos isoladamente. Para a análise da metilação dos genes relacionados à osseointegração pretende-se utilizar a técnica Specific Methylation-Sensitive Restriction Enzymes com 25 amostras de cada grupo. O DNA dos voluntários para análise dos polimorfismos será obtido a partir de células epiteliais da mucosa bucal. Antes do procedimento odontológico na sala do cirurgião-dentista e acompanhado por esse

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo  
Bairro: Alto da Glória  
UF: PR Município: CURITIBA  
Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.259.183

e pela pesquisadora. O voluntário realizará um bochecho com 3 ml de solução autoclavada de glicose a 3% (concentração isomolar com a saliva) durante 2 minutos. O bochecho será coleta em tubo autoclavado e nesta solução, será adicionado 1 ml de solução TNE (10mM Tris pH 8, 150mM NaCl e 2mM EDTA) e 1ml de Etanol absoluto, sendo o material congelado a -20 oC até o momento de uso. O DNA dos voluntários para análise da metilação será obtido a partir de células do tecido ósseo da região do implante dental, uma vez que o padrão de metilação é sitio específico. O tecido será obtido durante o procedimento de colocação do implante pelo cirurgião dentista através de material residual da broca de perfuração. Este resíduo ósseo geralmente é descartado pelo profissional. A pesquisadora receberá o material ósseo através do assistente cirúrgico e a amostra será lavada em solução fisiológica, acondicionado em tubos estéreis e congelado até o momento do uso. A extração do DNA das células da mucosa bucal será realizada conforme protocolo de Aidar e Line (2007). A extração do DNA das células do tecido ósseo será realizada conforme protocolo de Carvalho (2009). As sequências amplificadas serão analisadas por eletroforese em géis horizontais de Agarose 5% em Tampão TBE (89 mM de Tris-Borato, 89 mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA). A visualização dos fragmentos será feita em transluminador e a imagem capturada utilizando software Digi Doc.

**Critério de Exclusão:** Diabéticos, portadores de osteoporose, indivíduos imunodeprimidos, indivíduos com exposição prévia à radioterapia ou quimioterapia. Pacientes que apresentarem intercorrência pós-operatória, como infecções.

O material obtido será armazenado em biorrepositório e a pesquisadora se responsabiliza pelo uso de material biológico e informações associadas, resguardando a confidencialidade e o sigilo. O armazenamento das amostras possibilita a repetição do estudo, bem como realização de novos estudos. Todo e qualquer uso adicional de materiais e informações associadas serão formalizado através de emenda ao projeto original ou de um novo projeto de pesquisa igualmente submetido e aprovado pelo CEP. Os voluntários serão contactados para assinarem, caso queiram, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para cada pesquisa.

O número total de participantes desta pesquisa será de 250.

Este projeto será realizado durante o período de 06/2016 a 02/2019.

**Objetivo da Pesquisa:**

- Objetivo geral

Analisar polimorfismos e o padrão de metilação da região promotora dos genes envolvidos no

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.259.183

processo de osseointegração em células epiteliais da mucosa bucal e em células do tecido ósseo da região do implante em indivíduos com sucesso na osseointegração de implantes dentais e indivíduos fumantes e não fumantes com perda de implantes dentais, em estudo duplo cego.

- Objetivos específicos

1. Investigar a combinação haplotípica e regressão múltipla de polimorfismos em diferentes collagenases: MMP-1 (-1607 e -519) (rs1799750 e rs1144393); MMP-3 (-1612) (rs11225395) e MMP-9 (-1562) (rs2252070) e o risco perda de implante osseointegrados utilizando células da mucosa bucal.
2. Analisar a influência do padrão de metilação de DNA em genes relacionados ao no processo de osseointegração de fumantes e não-fumantes utilizando células ósseas da região do implante.
3. Contribuir para formação de recursos humanos na orientação de aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Não apresenta risco adicional ao paciente, uma vez que, para a obtenção das células da mucosa bucal, será utilizado bochecho de solução de glicose autoclavada 3% e a obtenção das células do tecido ósseo será obtido durante o procedimento de colocação do implante pelo cirurgião dentista através de material residual da broca de perfuração. Este resíduo ósseo retirado do paciente é geralmente descartado pelo profissional. As amostras biológicas serão armazenadas conforme a legislação preconiza.

Benefícios:

O benefício esperado com a pesquisa é a identificação de marcadores genéticos relacionados ao processo de osseointegração de implantes dentais. Dessa forma, espera-se contribuir para o conhecimento da etiologia e de fatores associados à falha de implante, podendo ajudar no reconhecimento de pacientes com fatores de risco e auxiliar o desenvolvimento de um tratamento adequado a estes. Nem sempre o voluntário será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem como instituição co-participante o Instituto de Pesquisa e Pós-Graduação em Odontologia (IPPO) localizado em Balneário Camboriú - Santa Catarina.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br



**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 2.259.183

O prontuário dos voluntários será utilizado para obter informações referente aos critérios de não inclusão, doenças prévias, uso de medicamentos, número e posição do implantes realizado e tratamentos prévios como enxertos ósseos e gengivais. As informações serão obtidas durante anamnese, sendo a coleta das mesma de responsabilidade do cirurgião dentista.

A pesquisadora relata que usará recurso próprio no valor de R\$ 6.000,00.

A pesquisadora declara também que o referido Departamento apresenta condições para o armazenamento seguro das amostras.

A pesquisadora solicita uma emenda no projeto: " Inclusão de Instituição coparticipante - Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico Ilapeo Ltda, CNPJ 070598640001-28, a fim de aumentar o número de pacientes, devido a dificuldade de obter a quantidade de amostras necessários para o estudo". A carta de concordância da instituição coparticipante foi anexada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos foram apresentados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto está aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: [www.cometica.ufpr.br](http://www.cometica.ufpr.br) (obrigatório envio)

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br)



**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 2.259.183

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_972617_E1.pdf	14/08/2017 16:20:39		Aceito
Outros	Carta_Solicitacao_Emenda.pdf	14/08/2017 16:19:17	Francielle Boçon de Araujo Munhoz	Aceito
Outros	6_Instituicao_Coparticipante_IPPOpdf.pdf	14/08/2017 16:17:15	Francielle Boçon de Araujo Munhoz	Aceito
Outros	6_Instituicao_Coparticipante_ILAPEpdf.pdf	14/08/2017 16:12:46	Francielle Boçon de Araujo Munhoz	Aceito
Outros	Resposta_Pendencias_emitidas_pelo_CEP.docx	19/05/2016 16:38:47	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.docx	19/05/2016 16:33:31	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	10_Uso_especifico_do_material_e_dados.pdf	04/04/2016 15:31:20	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	8_Termo_Confidencialidade.pdf	04/04/2016 15:29:12	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	2b_Atta_Colegiado_Aprovacao_Projeto_Francielle.pdf	04/04/2016 14:26:13	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	2a_Oficio_aprovacao_colegiado.pdf	04/04/2016 14:25:11	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	04/04/2016 14:20:22	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	check_list.pdf	04/04/2016 11:19:50	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisador.pdf	04/04/2016 10:33:04	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	04/04/2016 10:20:54	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITORIO.pdf	04/04/2016 10:20:01	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRAESTRUTURA.pdf	04/04/2016 10:19:42	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	4_Declaracao_corcordancia_orientador_pos_graduacao.pdf	04/04/2016 10:16:06	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	3_Analise_merito.pdf	04/04/2016 10:12:37	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	13_Termo_compromisso_utilizacao_dados_arquivos.pdf	31/03/2016 16:58:29	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	12_Termo_guarda_material.pdf	31/03/2016 16:57:43	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	11_Termo_Compromisso_inico_pesq	31/03/2016	Maria Cristina Leme	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO PARANÁ -**



Continuação do Parecer: 2.259.183

Outros	uisa.pdf	16:57:18	Godoy dos Santos	Aceito
Outros	9_Declaracao_Tomar_Publico_Resultado.pdf	31/03/2016 16:56:31	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Outros	1_Oficio_encaminhando_projeto.pdf	31/03/2016 16:48:54	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura.docx	15/03/2016 11:14:04	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPESQUISA.docx	15/03/2016 10:30:19	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	14/03/2016 09:37:38	Maria Cristina Leme Godoy dos Santos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CURITIBA, 05 de Setembro de 2017

---

**Assinado por:  
IDA CRISTINA GUBERT  
(Coordenador)**

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

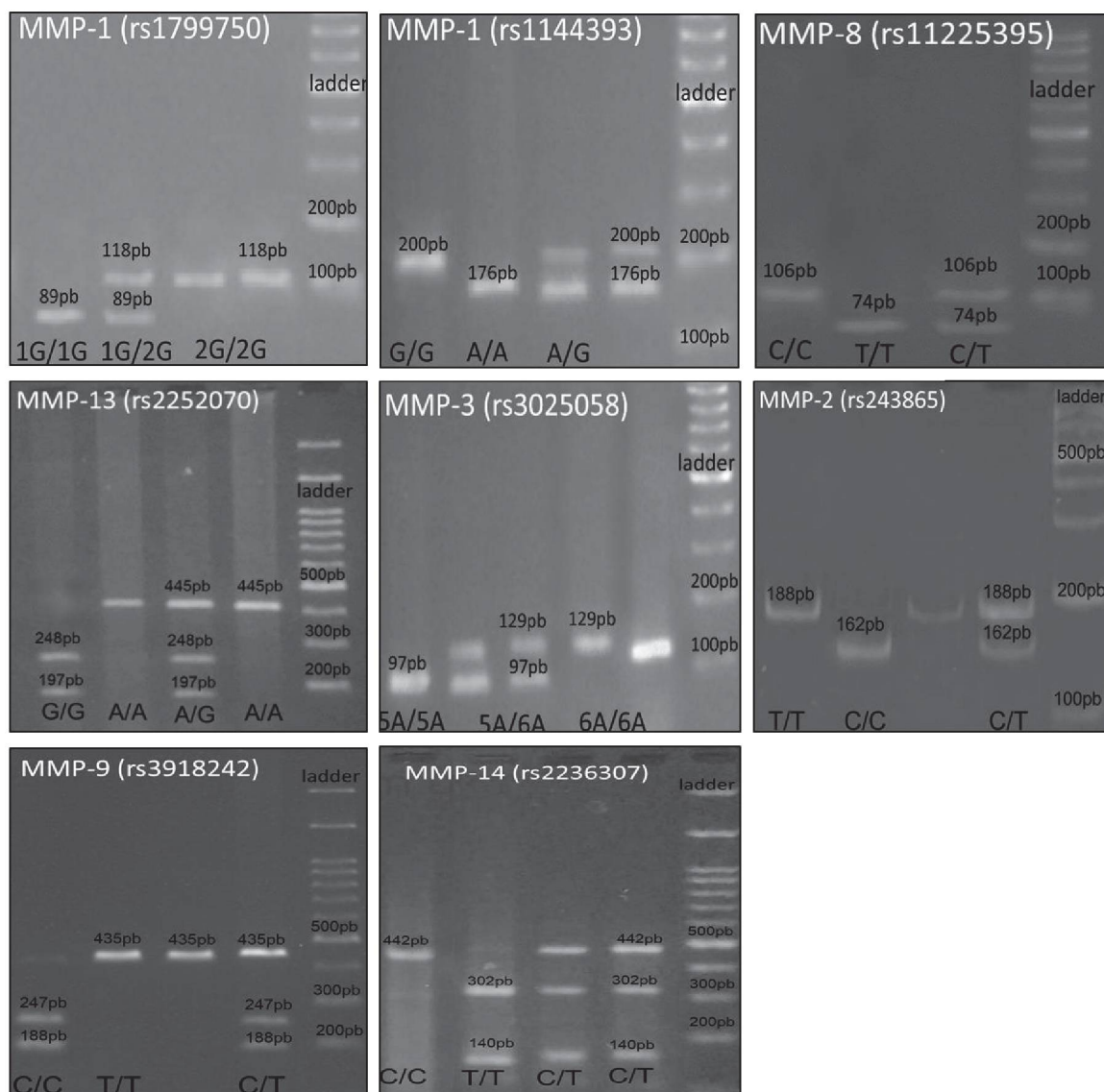
Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

**ANEXO II- IMAGEM DOS GÉIS DE ELETROFORESE COM OS PADRÕES DE BANDA DOS GENÓTIPOS, APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA (RFLP), CORADOS COM GEL RED, PARA MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307).**





**ANEXO III- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS GENES DA MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) NOS GRUPOS CASO E CONTROLE**

SNP	Grupo Controle	Grupo Caso	Valor p	OR * (95%CI)
MMP-1 (rs1799750)				
Alelo	n = 200	n = 200		
1G	78.5% (157)	62% (124)	p= 0.0005	2.24 (1.44-3.48)
2G	21.5% (43)	38% (76)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
1G/1G	63% (63)	33% (33)	p=0.0001	3.46 (1.93-6.19)
1G/2G	31% (31)	58% (58)		
2G/2G	06% (06)	09% (09)		
MMP-1 (rs1144393)				
Alelo	n = 200	n = 200		
A	59.5% (119)	65.5% (131)	p= 0.2559	0.77 (0.52-1.16)
G	40.5% (81)	34.5% (69)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
A/A	32% (32)	46% (46)	p= 0.0679	0.55 (0.31-0.98)
A/G	55% (55)	39% (39)		
G/G	13% (13)	15% (15)		
MMP-8 (rs11225395)				
Alelo	n = 200	n = 200		
C	40% (80)	24.5% (49)	p= 0.0013	0.49 (0.32-0.75)
T	60% (120)	75.5% (151)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
C/C	16% (16)	12% (12)	p= 0.0005	0.33 (0.19-0.59)
C/T	48% (48)	25% (25)		
T/T	36% (36)	63% (63)		
MMP-13 (rs2252070)				
Alelo	n = 200	n = 200		
A	64.5% (129)	76% (152)	p = 0.0161	0.57 (0.37-0.89)
G	35.5% (71)	24% (48)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
A/A	36% (36)	56% (56)	p = 0.007	0.44 (0.25- 0.78)
A/G	57% (57)	40% (40)		
G/G	07% (7)	04% (04)		
MMP-3 (rs3025058)				
Alelo	n = 200	n = 200		
5A	40.5% (81)	47% (94)	p= 0.2265	0.77 (0.52-1.14)
6A	59.5% (119)	53% (106)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
5A/5A	18% (18)	20% (20)	p=0.2412	0.88(0.43-1.78)
5A/6A	45% (45)	54% (54)		
6A/6A	37% (37)	26% (26)		
MMP-2 (rs243865)				
Alelo	n = 200	n = 200		
C	81.5% (163)	95% (190)	p<0.0001	0.23 (0.11-0.48)
T	18.5% (37)	5% (10)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
C/C	65% (65)	91% (91)	p<0.0001	0.18 (0.08-0.41)
C/T	33% (33)	8% (8)		
T/T	2% (2)	1% (1)		
MMP-9 (rs3918242)				
Alelo	n = 200	n = 200		
C	94% (188)	90.5% (181)	p= 0.2619	1.64 (0.78-3.48)
T	6% (12)	9.5% (19)		
Genótipo	n = 100	n = 100		
C/C	88% (88)	81% (81)	p= 0.2411	1.72 (0.79-3.76)
C/T	12% (12)	19% (19)		
T/T	0	0		
MMP-14 (rs2236307)				
Alelo	n = 134	n = 140		
T	60.402% (93)	80.714% (113)	<0.0427	0.54 (0.31-0.95)
C	30.597% (41)	19.285% (27)		
Genótipo	n = 67	n = 70		
T/T	43.283% (29)	62.857% (44)	<0.033	0.45 (0.23-0.89)
C/T	52.238% (35)	35.714% (25)		
C/C	4.477% (3)	1.428% (1)		

**ANEXO IV- MODELOS ANALISADOS NA REGRESSÃO LOGÍSTICA MÚLTIPLA PARA OS GENES MMP-1 g.-1607 G>GG (rs1799750), MMP-1 g.-519 A>G (rs1144393), MMP-8 g.-799 C>T (rs11225395), MMP-13 g.-77 A>G (rs2252070), MMP-3 g.-1612 5A>6A (rs3025058), MMP-2 g.-1306 C>T (rs243865), MMP-9 g.-1562 C>T (rs3918242) E MMP-14 g.+7096 T>C (rs2236307) NOS GRUPOS CASO E CONTROLE**

<b>SNPs</b>	<b>Genótipos</b>	<b>Valor z</b>	<b>Valor p</b>
<b>Modelo Codominante</b>			
MMP-1 (rs1799750)	1G1G x 1G2G x 2G2G	4.331	1.49e-05
MMP-1 (rs1144393)	AA x AG x GG	0.293	0.7697
MMP-8 (rs11225395)	CC x CT x TT	-5.789	7.07e-09
MMP-13 (rs2252070)	AA x AG x GG	-2.675	0.00748
MMP-3 (rs3025058)	5A5A x 5A6A x 6A6A	-0.579	0.5627
MMP-2 (rs243865)	CC x CT x TT	3.899	9.66e-05
MMP-9 (rs3918242)	CC x CT x TT	-1.357	0.175
MMP-14 (rs2236307)	CC x CT x TT	- 2.350	0.0188
<b>Modelo Dominante</b>			
MMP-1 (rs1799750)	2G2G x 1G2G + 1G1G	0.943	0.3457
MMP-1 (rs1144393)	GG x AA + AG	0.290	0.7718
MMP-8 (rs11225395)	CC x CT + TT	-2.138	0.0325
MMP-13 (rs2252070)	GG x AA + AG	0.919	0.358
MMP-3 (rs3025058)	5A5A x 5A6A + 6A6A	-0.145	0.8850
MMP-2 (rs243865)	TT x CC + CT	-0.563	0.574
MMP-9 (rs3918242)*	TT x CC + CT	N/A	N/A
MMP-14 (rs2236307)	CC x CT + TT	1.005	0.315
<b>Modelo Recessivo</b>			
MMP-1 (rs1799750)	1G1G x 1G2G + 2G2G	-4.334	1.47e-05
MMP-1 (rs1144393)	AA x AG + GG	-0.032	0.974
MMP-8 (rs11225395)	TT x CT + CC	5.407	6.41e-08
MMP-13 (rs2252070)	AA x AG + GG	-2.817	0.00484
MMP-3 (rs3025058)	6A6A x 5A6A + 5A5A	-0.205	0.838
MMP-2 (rs243865)	CC x CT + TT	-4.114	3.89e-05
MMP-9 (rs3918242)	CC x CT + TT	1.357	0.175
MMP-14 (rs2236307)	TT x CT + CC	-2.280	0.0226

\*O resultado da MMP-9 modelo dominante foi indicado com N/A (não aplicável), pois, não tivemos amostras com genótipo TT na população estudada.